

Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas

**ESTUDIO DE PROPIEDADES DE AISLADOS  
PROTEICOS DE SOJA  
INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO TERMICO Y  
DEL CONTENIDO DE CALCIO**

**Estela Laura Arrese**

Tesis

1991

Autón

15-XI-91

73 291

53 731



A José Luis y Natalia  
A mis padres

Don autor

15-XI-91  
Inv. 73294 53 7-31



## Mi agradecimiento

a la Dra. María Cristina Añón por su guía, dedicación y por haberme brindado el marco de libertad necesario para mi formación,

al Dr. Jorge R. Wagner por haberme facilitado el acceso al estudio de las proteínas de soja,

al Ing. Néstor Serena por su inestimable colaboración en el funcionamiento de los equipos,

a Sergio Torres, José Luis Alonso y Arturo Colavita por su permanente apoyo técnico,

a mis compañeros del CIDCA en general por el trato afectuoso y el apoyo que me brindaron,

a la Sra. Silvia A. Moya por el cuidadoso tipeado de este trabajo,

a las instituciones Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CIC BA), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, por los medios económicos otorgados para el desarrollo de este trabajo.

## INDICE

	Página
1. INTRODUCCION	
1.1. Importancia de las proteínas vegetales . . . . .	1
1.2. La soja, un cultivo milenario . . . . .	2
1.3. Proteínas de soja . . . . .	3
1.4. Características de las proteínas mayoritarias de soja . . . . .	5
1.4.1. b-conglicinina (globulina 7S) . . . . .	5
1.4.2. Glicinina (globulina 11S) . . . . .	7
1.5. Procesamiento del poroto de soja . . . . .	10
1.6. Uso de las proteínas de soja . . . . .	15
1.7. Funcionalidad proteica . . . . .	17
OBJETIVOS . . . . .	22
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1. Aislados y fracciones proteicas utilizadas . . . . .	23
2.1.1. Aislados proteicos de soja de origen comercial . . . . .	23
2.1.2. Aislados proteicos de soja obtenidos en el laboratorio . . . . .	24
2.1.2.1. Procedimiento básico de obtención de aislados proteicos de soja . . . . .	24
2.1.2.2. Modificaciones efectuadas al procedimiento básico . . . . .	25
a) Relación harina:agua . . . . .	25
b) pH de extracción . . . . .	25
c) Reextracciones sucesivas . . . . .	25
d) Tratamiento térmico . . . . .	26
2.1.2.3. Modificaciones de los aislados proteicos de soja obtenidos en el laboratorio . . . . .	26
a) Tratamiento térmico . . . . .	26
b) Tratamiento térmico a distintas concentraciones de proteínas . . . . .	26
c) Agregado de calcio . . . . .	26
2.1.3. Obtención de las proteínas $\beta$ -conglicinina (7S) y glicinina (11S) . . . . .	27
2.1.4. Obtención de los aislados proteicos de soja empleados en el estudio de la cinética de desnaturalización térmica . . . . .	29

	Página
2.2. Composición química de los aislados proteicos de soja estudiados . . . . .	30
2.2.1. Determinación del contenido de proteína total . . . . .	30
2.2.2. Determinación del contenido de cenizas . . . . .	30
2.2.3. Determinación de humedad . . . . .	31
2.2.4. Determinación de iones . . . . .	31
2.2.4.1. Preparación de la muestra . . . . .	31
2.2.4.2. Espectrometría de emisión con plasma de argón . . . . .	31
2.2.4.3. Espectrometría de absorción atómica . . . . .	32
2.2.5. Análisis de lípidos . . . . .	33
2.2.5.1. Extracción de los lípidos . . . . .	33
2.2.5.2. Cromatografía en columna de ácido silícico . . . . .	33
2.2.5.3. Cromatografía en capa delgada . . . . .	34
2.2.6. Determinación del contenido de grupos sulfhidrilos libres y totales . . . . .	35
2.3. Determinación de propiedades fisicoquímicas en los aislados de proteínas de soja analizados . . . . .	36
2.3.1. Hidrofobicidad . . . . .	36
2.3.1.1. Determinación de la hidrofobicidad superficial . . . . .	37
2.3.1.2. Determinación de la hidrofobicidad superficial de las proteínas totales . . . . .	38
2.3.2. Calorimetría diferencial de barrido . . . . .	39
2.3.2.1. Calibración del equipo . . . . .	41
2.3.2.2. Cálculo de las constantes cinéticas del proceso de desnaturalización térmica de las proteínas de soja . . . . .	44
2.3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) . . . . .	44
2.3.3.1. Soluciones empleadas . . . . .	45
2.3.3.2. Preparación de los geles . . . . .	47
2.3.3.3. Preparación de las muestras . . . . .	47
2.3.3.4. Condiciones de corrida . . . . .	48
2.3.3.5. Estimación de los pesos moleculares . . . . .	48
2.3.3.6. Densitografía de los geles . . . . .	49
2.4. Determinación de propiedades funcionales en los aislados de proteínas de soja estudiados . . . . .	50
2.4.1. Solubilidad . . . . .	50

	Página
2.4.2. Capacidad de absorción de agua . . . . .	50
2.4.2.1. Equipo empleado . . . . .	51
2.4.2.2. Capacidad de absorción de agua de las fracciones proteicas solubles e insolubles . . . . .	51
2.4.2.3. Grado de agregación de las proteínas en las fracciones solubles e insolubles . . . . .	54
2.4.3. Viscosidad . . . . .	54
2.4.3.1. Relación de agua total a agua embebida (T/I) . . . . .	55
2.4.4. Capacidad de gelificación . . . . .	55
2.4.5. Capacidad de emulsificación . . . . .	56
2.4.6. Tratamiento estadístico . . . . .	57
 3-5. RESULTADOS Y DISCUSION	
3. Aislados proteicos de soja de origen comercial . . . . .	58
3.1. Caracterización . . . . .	58
3.1.1. Composición química de los aislados . . . . .	58
3.1.1.1. Determinación del contenido de proteínas, lípidos, cenizas y humedad . . . . .	58
3.1.1.2. Análisis cuantitativo de calcio, sodio, magnesio, potasio y fósforo . . . . .	58
3.1.1.3. Análisis cuali y cuantitativo de lípidos . . . . .	62
3.1.2. Grado de desnaturalización proteica . . . . .	65
3.1.3. Composición proteica . . . . .	70
3.1.3.1. Composición relativa de las diferentes especies proteicas presentes en los aislados . . . . .	70
3.1.3.2. Composición relativa de las diferentes especies proteicas de las fracciones solubles en agua . . . . .	72
3.1.3.3. Comparación entre las especies proteicas solubles en agua y en NaCl 0,2M . . . . .	76
3.1.4. Contenido de grupos sulfhidrilos libres y totales . . . . .	78
3.1.4.1. Resultados de la determinación . . . . .	78
3.1.4.2. Análisis de las muestras con distinto contenido de grupos SH libres mediante SDS-PAGE sin tratamiento previo con 2-mercaptoetanol . . . . .	81
3.1.4.3. Comparación entre los resultados del contenido de grupos sulfhidrilos libres y los perfiles electroforéticos . . . . .	84
3.1.5. Determinación de la hidrofobicidad superficial . . . . .	85

	Página
3.2. Propiedades funcionales . . . . .	88
3.2.1. Solubilidad . . . . .	88
3.2.1.1. Relación entre la solubilidad y el grado de desnaturalización proteica . . . . .	88
3.2.1.2. Comparación entre la solubilidad en NaCl 0.2M y en agua destilada . . . . .	90
3.2.1.3. Efecto del calcio en la solubilidad de las proteínas de soja . . . . .	90
3.2.1.4. Relación entre la solubilidad y la hidrofobicidad superficial . . . . .	92
3.2.1.5. Variación de solubilidad con el pH . . . . .	94
3.2.1.6. Comportamiento de la solubilidad en relación a la hidrofobicidad del aislado total . . . . .	96
3.2.1.7. Modificación de la solubilidad por almacenamiento . . . . .	98
3.2.2. Capacidad de absorción de agua (WIC) . . . . .	101
3.2.2.1. Resultados de la determinación . . . . .	101
3.2.2.2. Incidencia del grado de desnaturalización y de agregación en la capacidad de absorción de agua . . . . .	103
3.2.3. Viscosidad . . . . .	113
3.2.3.1. Consideraciones generales . . . . .	113
3.2.3.2. Resultado de las determinaciones efectuadas . . . . .	116
3.2.3.3. Incidencia de la concentración proteica y el grado de hidratación en la viscosidad aparente . . . . .	118
3.2.3.4. Variación de la viscosidad aparente con la relación T/I . . . . .	121
3.2.4. Capacidad de gelificación . . . . .	124
3.2.5. Capacidad de emulsificación . . . . .	127
4. Aislados proteicos de soja obtenidos en el laboratorio . . . . .	143
4.1. Modificación de propiedades de aislados proteicos de soja por tratamiento térmico y agregado de calcio . . . . .	134
4.1.1. Optimización del procedimiento básico de extracción . . . . .	134
4.1.2. Efecto del tratamiento térmico . . . . .	138
4.1.2.1. Grado de desnaturalización proteica . . . . .	138
4.1.2.2. Hidrofobicidad superficial . . . . .	140
4.1.2.3. Composición proteica de la fracción soluble . . . . .	143
4.1.2.4. Contenido de grupos sulfhidrilos libres . . . . .	149
4.1.2.5. Solubilidad y capacidad de absorción de agua . . . . .	149

	Página
4.1.3. Efecto del agregado de calcio . . . . .	152
4.1.3.1. Comportamiento de la solubilidad e hidrofobicidad superficial de aislados tratados con $\text{CaCl}_2$ . . . . .	154
4.1.3.2. Capacidad de absorción de agua de aislados tratados con $\text{CaCl}_2$ . . . . .	156
4.1.3.3. Capacidad de emulsificación de aislados tratados con $\text{CaCl}_2$ . . . . .	156
4.1.3.4. Solubilidad de aislados tratados con $\text{Ca(OH)}_2$ con proteínas nativas o desnaturalizadas . . . . .	159
4.1.3.5. Capacidad de absorción de agua de aislados con proteínas nativas o desnaturalizadas tratados con $\text{Ca(OH)}_2$ . . . . .	159
4.1.3.6. Capacidad de emulsificación de aislados con proteínas nativas o desnaturalizadas, tratados con $\text{Ca(OH)}_2$ . . . . .	163
4.1.3.7. Especies proteicas presentes en la fracción soluble de aislados tratados con calcio . . . . .	165
5. Cinética de desnaturalización térmica de proteínas de soja . . . . .	167
5.1. Aislados proteicos dializados . . . . .	167
5.2. Fracciones proteicas parcialmente desnaturalizadas . . . . .	178
5.3. Estimación de las funciones termodinámicas del estado activado . . . . .	181
CONCLUSIONES . . . . .	187
BIBLIOGRAFIA . . . . .	190



Algunos de los resultados incluidos en el capítulo referente a aislados comerciales han surgido del trabajo conjunto de la Lic. Estela L. Arrese y los Dres. Delia A. Sorgentini; Jorge R. Wagner y Maria Cristina Añon

# INTRODUCCION

### 1.1. IMPORTANCIA DE LAS PROTEINAS VEGETALES

A lo largo de la historia, las proteínas vegetales han constituido una fuente importante en la alimentación del hombre. Actualmente una gran proporción de la población mundial, ya sea por opción o por necesidad, subsiste a base de una dieta vegetariana.

En varios países subdesarrollados los vegetales proporcionaron los nutrientes esenciales de la población. Sin embargo, para la mayoría de los habitantes de las regiones más desarrolladas la principal fuente de proteínas es de origen animal.

El deterioro mundial de la situación de los alimentos, consecuencia de la explosión demográfica y de su desigual distribución, ha actuado en algunos países como estímulo en la búsqueda de fuentes alternativas de alimentos. En este sentido las proteínas vegetales representan un recurso conveniente tanto desde el punto de vista nutricional como económico. En los últimos quince años se ha producido, en el campo de la tecnología de alimentos, uno de los mayores desarrollos. El mismo ha facilitado el procesamiento de las proteínas vegetales a formas que posibilitan su aplicación en los alimentos formulados sustituyendo o reemplazando proteínas de origen animal. En este avance las proteínas de soja han constituido un pilar fundamental, a pesar que se conocen numerosos vegetales aptos para la obtención de proteínas tales como avena, lupín, maní, arveja, algodón, etc. Uno de los factores que ha contribuido a favorecer el uso de la soja es la calidad nutricional de sus proteínas. Las mismas tienen un alto contenido de aminoácidos esenciales particularmente de lisina, isoleucina y leucina, siendo pobres en aminoácidos azufrados, especialmente en metionina (Young y col., 1979). Asimismo, es de destacar el alto porcentaje de proteínas del poroto lo que convierte a la soja en una fuente de alto rendimiento. También es importante el hecho que sea un cultivo extensivo que se realiza en

vastas regiones del mundo. Cabe señalar que nuestro país es un gran productor de soja ocupando el cuarto lugar a nivel mundial, precedido por Estados Unidos de Norteamérica, Brasil y China (Coscia, 1989). En los últimos años el área sembrada ha ido aumentando en forma constante alcanzando en la campaña 89/90 5.093.000 ha, con un volumen de producción de 10.667.000 toneladas (Junta Nacional de Granos, 1990).

Argentina ocupa asimismo el tercer lugar dentro de los países exportadores de poroto de soja, siendo superado por Estados Unidos de Norteamérica y Brasil.

### 1.2. LA SOJA, UN CULTIVO MILENARIO

La soja pertenece a la familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionaceae*, género *Glycine max*. Es originaria de las provincias del norte de China desde donde se extendió a vastas regiones del continente asiático. Desde hace unos dos mil años se la emplea como fuente alimenticia y medicinal. A partir de ella se obtienen una gran variedad de productos, tales como aceite, leche de soja, tofu, miso, tempe, etc. La primer extracción de aceite de soja fue llevada a cabo en Manchuria en el 1700, naciendo así una nueva industria la cual se extendió a lo largo y ancho del mundo.

Recién en 1712 la soja fue introducida en Europa y en 1804 en Estados Unidos de Norteamérica, donde se la utilizó originalmente como materia prima para la obtención de aceite y de harina destinada al consumo animal. Una vez finalizada la segunda guerra mundial y debido a la urgente necesidad de producir alimentos económicos se enfatizó el desarrollo de tecnologías que permitieron disponer de proteínas de soja adecuadas y aceptables para la alimentación humana (Pearson, 1982).

Las proteínas se obtienen a partir del poroto el cual contiene 20% de lípidos, 35% de hidratos de carbono, 42% de proteínas y 5% de cenizas (Pearson, 1982). En su gran mayoría las proteínas son de reserva y se encuentran almacenadas en los cotiledones en partículas subcelulares denominadas cuerpos proteicos (tamaño 2-20  $\mu\text{m}$ ). Por su parte el aceite se ubica en estructuras más pequeñas (tamaño 0,2-0,5  $\mu\text{m}$ ), los esferosomas, los que se localizan entre los cuerpos proteicos. Estas proteínas actúan como material de reserva el cual puede rápida y eficientemente movilizarse y contribuir a la germinación y crecimiento de la plántula. Hasta el presente no se ha detectado ninguna actividad enzimática asociada a las mismas.

1.3. PROTEINAS DE SOJA

La composición de las proteínas presentes en la harina desgrasada de soja extraíbles en medio acuoso ha sido estudiada por varios investigadores. Wolf (1970) subdividió a las proteínas de soja en cuatro fracciones (2S, 7S, 11S y 15S) acorde a su comportamiento en un análisis de ultracentrifugación.

Fracción	Cantidad respecto al contenido de proteína total (%)	Componentes principales	Pesos moleculares (Kda)
2S	22	inhibidores de tripsina citocromo C	8,0 21,5 12,0
7S	37	hemaglutinina lipoxigenasa $\beta$ -amilasa globulina 7S	110,0 102,0 61,7 180,0-210,0
11S	31	globulina 11S	350,0
15S	11	-	~ 600,0

La fracción 2S contiene varios factores antinutricionales que actúan a nivel del intestino complejando a la tripsina y por ende inhibiendo su acción. Esto desencadena una producción descontrolada de enzima por parte del páncreas debido a la interrupción del mecanismo de retroalimentación negativo (feedback) que ejerce la tripsina sobre el mencionado órgano. El mantenimiento de esta alteración conduce a la hipertrofia del páncreas (Liener, 1979). Afortunadamente estos factores antinutricionales son termolábiles y para su inactivación basta un tratamiento térmico a 100°C durante 10 minutos (Rackis, 1972). Se ha comprobado que ratas alimentadas por largos períodos con preparaciones comerciales de soja (harina, concentrados o aislados proteicos) no evidencian ningún tipo de alteración. Este hecho indica claramente que el empleo de procesamientos adecuados permite la inactivación de los factores antinutricionales y por ende el uso de productos ricos en proteínas de soja para la alimentación humana (Pearson, 1982).

Con respecto a la fracción 15S, la misma aún no ha sido bien caracterizada. Sin embargo, dado que se la encuentra cuando se procede a la purificación de la globulina 11S, no se puede descartar que la misma sea el resultado de la asociación mediante uniones disulfuro de proteínas 11S (Kilara, 1976).

Las fracciones 7S y 11S representan los componentes proteicos mayoritarios del poroto de soja, constituyendo cada una de ellas un tercio del contenido total de proteínas. La fracción 11S consiste primariamente en una única proteína, la globulina 11S (Wolf y Cowan, 1975), mientras que la fracción 7S está compuesta al menos por cuatro componentes (Wolf, 1970), siendo el mayoritario la globulina 7S la cual representa la mitad de la proteína total de la fracción (Wolf y Sly, 1967).

En la postrimería de los años sesenta se desarrolló una nueva nomenclatura para las principales globulinas de soja, nomenclatura basada en un

sistema inmunoquímico de referencia. Siguiendo este procedimiento fueron aislados cuatro componentes antigénicamente diferentes los cuales se denominaron  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  conglicinina y glicinina, respectivamente (Catsimpoolas y col., 1968; Catsimpoolas, 1969).

La fracción glicinina es idéntica a la fracción 11S, en tanto que  $\alpha$  conglicinina se corresponde con la fracción 2S. La identidad de las dos fracciones restantes permaneció poco clara hasta 1976 cuando Koshiyama y Fukushima (1976 a y b) identificaron a  $\beta$ -conglicinina con la porción de la fracción 7S que dimeriza al variar la fuerza iónica de la solución proteica de 0,5 a 0,1 a pH 7,6 y a  $\gamma$  conglicinina con aquella porción de proteína que no dimeriza a fuerza iónica 1,0.  $\beta$ -conglicinina representa la proteína mayoritaria de la fracción 7S siendo su contenido diez veces superior al de  $\gamma$  conglicinina (Koshiyama y Fukushima, 1976 a y b).

Del análisis de las clasificaciones efectuadas por Wolf (1970) y Catsimpoolas y col. (1968) y Catsimpoolas (1969) surge claramente que  $\beta$ -conglicinina y glicinina son las principales proteínas de reserva presentes en el poroto de soja, representando el 70% del contenido total de proteína de la semilla (Hill y Breindenbach, 1974).

### 1.4. CARACTERISTICAS DE LAS PROTEINAS MAYORITARIAS DE SOJA

#### 1.4.1. $\beta$ -conglicinina (globulina 7S)

Quince años atrás existía una gran incertidumbre y confusión respecto a la estructura e identidad de la proteína 7S. Afortunadamente esta situación ha sido clarificada merced a los estudios de síntesis de proteínas "*in vitro*" realizados y a la disponibilidad de mayor cantidad de datos sobre la secuencia primaria de la proteína.

## 1. INTRODUCCION

Se sabe que la  $\beta$ -conglycinina es una glicoproteína constituida por tres subunidades , denominadas  $\alpha'$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ , que se presenta como un monómero (7S) con gran tendencia a formar dímeros (9S) a baja fuerza iónica.

Las tres subunidades, anteriormente mencionadas, que conforman la molécula pueden o no ser idénticas. Hasta el presente han sido descritas siete formas distintas de  $\beta$ -conglycinina, con una composición de subunidades diferente. Las mismas han sido clasificadas en cuatro grupos de acuerdo al contenido de subunidades  $\beta$  que contenga la molécula. Cada grupo además ha sido caracterizado acorde al peso molecular, composición del extremo N-terminal y contenido de carbohidratos (Iibuchi e Imahori, 1978; Thanh y Shibasaki, 1976b, 1977, 1978; Sykes y Gayler, 1981; Yamauchi y col., 1981).

Grupo	Compo- nente	Composición de subunidades	Peso molecular	Aminoácido N-terminal	Contenido de carbohidratos (%)
-	B <sub>0</sub>	$\beta_3$	126-137.000	Leu	-
A	B <sub>1</sub>	$\alpha' \beta_2$	171.000	Val + Leu	2,65 - 5,23
	B <sub>2</sub>	$\alpha \beta_2$			
B	B <sub>3</sub>	$\alpha\alpha' \beta$	181.000	Val + Leu	4,42 - 4,96
	B <sub>4</sub>	$\alpha_2 \beta$			
C	B <sub>5</sub>	$\alpha_2 \alpha'$	199.000	Val	3,89 - 4,00
	B <sub>6</sub>	$\alpha_3$			

Cabe señalar que de acuerdo a la nomenclatura utilizada por Iibuchi e Imahori (1978) el grupo A corresponde al C y viceversa.

Varios grupos de investigación, empleando métodos bioquímicos tradicionales, han determinado el peso molecular de las subunidades de  $\beta$ -congli-



cinina sin existir coincidencia. Los valores informados para las subunidades  $\alpha$  varían entre 57.000 y 83.000, mientras los correspondientes a la subunidad  $\beta$  lo hacen entre 42.000 y 53.000 (Thanh y Shibasaki, 1977; Iibuchi e Imahori, 1978; Beachy y col., 1981) . A juzgar por los pesos moleculares observados de los protómeros de  $\beta$ -conglycinina y los datos de secuencia que existen, parecerían más probables los valores de pesos moleculares inferiores. Se han determinado también los puntos isoiónicos y los aminoácidos del extremo N-terminal de cada subunidad siendo los valores informados 4,9; 5,2 y 5,7-6 y val, val y leu para  $\alpha$ ,  $\alpha'$  y  $\beta$ , respectivamente.

La  $\beta$ -conglycinina posee dos sitios de glicosilación a los que se unen manosa y glucosamina. Estudios de resonancia nuclear magnética han demostrado que de seis a ocho residuos de manosa se agregan en una configuración ramificada la cual se une al residuo asparagina a través de dos moléculas de N-acetil-glucosamina (Yamauchi y col., 1976). Aún no ha sido dilucidado el rol preciso que juega la glicosilación de  $\beta$ -conglycinina y de otras globulinas 7S.

La proteína 7S además de glicosilación sufre proteólisis post-transcripcional en todas las subunidades que la conforman; aparentemente la misma tiene lugar en los cuerpos proteicos o luego del ensamble parcial de la estructura oligomérica de la proteína (Coates y col., 1985; Schuler y col., 1982).

### 1.4.2. Glicinina (globulina 11S)

La glicinina (11S) es una proteína oligomérica cuyo peso molecular es aproximadamente 350.000 y su punto isoeléctrico 4,54 (Koshiyama, 1972). De acuerdo a los métodos de estimación empleados se han informado valores de peso molecular en el rango 309.000-373.000 (Badley y col., 1975; Kitamura y

col., 1976; Koshiyama, 1972; Utsumi y col., 1981; Nielsen, 1985). Su composición de aminoácidos muestra que es una proteína pobre en metionina y rica en lisina (Catsimpoolas y col., 1971a) con un contenido de aminoácidos hidrofílicos del 23,59 % con respecto al contenido total de aminoácidos (Takagi y col., 1979).

El análisis del extremo N-terminal de la proteína purificada ha revelado que la globulina 11S tiene tres clases de aminoácidos N-terminal, glicina, fenilalanina y leucina (isoleucina) (Mitsuda y col., 1965), en una relación molar 8:2:2 (Catsimpoolas y col., 1967).

Koshiyama (1972) mediante estudios de dispersión óptica rotatoria concluyó que la estructura secundaria de esta proteína comprende 5,2% de  $\alpha$ -hélice, 34,8% de estructura  $\beta$  y 60% de estructura al azar (random coil). Cabe mencionar que numerosos factores pueden alterar la conformación de la proteína 11S, entre los que se encuentran pH, alta concentración salina, presencia de urea, temperatura, etc.

La molécula de glicinina contiene doce cadenas polipeptídicas (Catsimpoolas y col., 1967; Catsimpoolas, 1969, 1970). El modelo propuesto originalmente considera que la proteína 11S está constituida por seis subunidades llamadas subunidades intermedias. Cada una de ellas está formada por dos cadenas polipeptídicas, una ácida (polipéptido A) y otra básica (polipéptido B) designadas de acuerdo a los puntos isoelectrónicos que poseen, siendo sus valores 4,8-5,2 y 8,0-8,5, respectivamente (Catsimpoolas y col., 1971b). Ambos polipéptidos se encuentran unidos covalentemente por medio de un puente disulfuro (Staswick y col., 1981). Según este modelo las subunidades AB se acomodan formando dos hexágonos idénticos colocados uno encima del otro, asociados por fuerzas electrostáticas y uniones hidrógeno (Badley y col., 1975).

Además de los seis puentes disulfuro interpolipeptídicos A-B, también han sido determinadas entre 0-2 uniones disulfuro intracadena A y entre 0-1

en los polipéptidos B, con lo cual el número de uniones totales de la molécula de glicinina es aproximadamente veinte (Kim y Kinsella, 1986). Esto determina que sea una molécula rígida y compacta.

Distintos estudios han mostrado heterogeneidad en los polipéptidos ácidos y básicos, heterogeneidad que puede depender de la variedad de soja empleada. En ese sentido Catsimpoolas y col. (1971a) y Catsimpoolas (1969) indicaron la existencia de tres subunidades A y tres subunidades B, mientras que Kitamura y Shibasaki (1975) y Kitamura y col. (1976) informaron la presencia de cuatro polipéptidos ácidos y cuatro polipéptidos básicos. Mori y col. (1979) por su parte hallaron cinco subunidades A y cuatro subunidades B y Staswick y col. (1984) encontraron seis polipéptidos ácidos y cinco básicos en sus preparaciones de 11S. El peso molecular de las subunidades A y B individuales está en el rango de 27.000-37.000 y 20.000-24.000, respectivamente, variando acorde al método de estimación empleado (Iyengar y Ravestein, 1981; Kitamura y Shibasaki, 1975; Badley y col., 1975; Mori y col., 1979).

La composición de aminoácidos de los polipéptidos A y B es naturalmente diferente. Las subunidades acídicas tienen un contenido mayor de ácido glutámico, prolina y cisteína que las subunidades básicas, mientras que estas últimas son más ricas en aminoácidos hidrofóbicos que las subunidades A (Catsimpoolas y col., 1971a; Ochiai-Yanagi y col., 1977).

Mori y col. (1981) indicaron que en algunas variedades de soja suele encontrarse una subunidad proteica extra, que generalmente es un polipéptido ácido. Estas subunidades aparecen unidas a otros componentes de la molécula de glicinina a través de interacciones susceptibles al tratamiento con dodecilsulfato de sodio y urea. Iyengar y Ravenstein (1981) señalaron que las subunidades A extras serían dos en total por molécula de proteína 11S y se ubicarían en el hueco central que determinan los dos hexágonos formados por subunidades AB.

En la actualidad se ha alcanzado una mayor comprensión de la estructura de la molécula de glicinina merced a las experiencias de síntesis de proteínas in vitro llevadas a cabo. Los resultados obtenidos indican la síntesis de un precursor de peso molecular 60.000 proveniente de un único gen, el cual luego es cortado en un polipéptido ácido y uno básico. El modelo actual para la glicinina se basa en la existencia de pares A-B específicos como subunidad fundamental, arreglados de manera tal que los polipéptidos básicos se ubiquen en el interior formando un corazón hidrofóbico de la subunidad o de la globulina como un todo. Esto protegería a los polipéptidos muy hidrofóbicos del medio polar y del ataque de proteasas (Barton y col., 1982; Ereken-Tumer y col., 1982).

Un conocimiento más profundo y veraz tanto de la estructura terciaria como cuaternaria de glicinina, así como de otras globulinas de reserva, se obtendrá cuando las mismas puedan ser cristalizadas. Desde el punto de vista químico la proteína 11S puede sufrir una serie de reacciones que involucren la agregación molecular, desnaturalización y agregación térmica, crioprecipitación, reacciones de asociación-disociación, unión de metales, reacciones inmunológicas, etc. De todas ellas, desde el punto de vista de la funcionalidad proteica, las más importantes son las reacciones de asociación-disociación, las cuales son afectadas por diversos factores: pH, temperatura, tratamientos con mercaptoetanol, urea y cloruro de guanidina, presencia de alcohol, EDTA y detergentes, etc.

### 1.5. PROCESAMIENTO DEL POROTO DE SOJA

El procesamiento comercial en gran escala de la soja en los países occidentales data de comienzos de 1920, a pesar que en el oriente se obtienen una gran variedad de productos desde hace cientos de años.

En las etapas tempranas del desarrollo tecnológico de esta leguminosa se la consideraba alimento para consumo animal y se puso gran énfasis en la obtención de productos y subproductos para uso técnico e industrial. Con el correr del tiempo, en los principales países productores de soja, se ha establecido una demanda competitiva por su empleo como alimento o para usos no alimentarios. Este hecho se ve reflejado, por ejemplo en los Estados Unidos de Norteamérica, en las siguientes cifras: en 1947 el 53% de los productos de soja derivaban del aceite y el 47% restante de la harina, mientras que en 1970 el 42% provenían del aceite y el resto de la harina (58%) (Foods and Food Production Encyclopedia, 1982).

Los principales productos primarios derivados de la soja son, tal como se mencionara previamente, el aceite y la harina, sirviendo éstos de materia prima para la elaboración de otros productos. Dados los objetivos de este trabajo de tesis, centraremos nuestra atención principalmente en aquellos productos ricos en proteínas destinados al consumo humano. Los mismos pueden ser subdivididos en cuatro categorías: - harina de soja; - concentrados proteicos; - aislados proteicos y - proteínas texturizadas.

Para la obtención de harina de soja debe procederse a la extracción del aceite del poroto. Ello se logra fundamentalmente por extracción con solventes (hexano) o una combinación de prensado y extracción. Para facilitar el proceso de extracción del aceite el poroto limpio debe previamente ser partido, descascarado y acondicionado. Una vez separado el aceite se procede a la eliminación de restos de solvente de la materia sólida, etapa ésta crítica en el control de calidad de la harina de soja. Este paso (desolventización-tostado) tiene en realidad tres finalidades: eliminación del solvente, destrucción de la actividad ureásica y mejoramiento de la calidad nutricional (inactivación de los inhibidores de tripsina y mejora del sabor y aroma de la harina) (Serrato, 1981; Mustakas y col., 1981).

La optimización del proceso de desolventización-tostado se logra controlando el contenido de humedad, la temperatura y el tiempo. Para obtener harinas para consumo humano o productos posteriormente procesados a partir de ellas, las condiciones de calentamiento deben ser suaves. La desnaturalización de las proteínas se reduce empleando tiempos mínimos de retención a baja temperatura y bajo contenido de humedad (Pearson, 1982). En la práctica el grado de desnaturalización alcanzado se mide a través de la determinación del índice de nitrógeno soluble (NSI) o el índice de proteína dispersable (PDI). El contenido de proteína de la harina de soja es aproximadamente 50%, en tanto que el valor del PDI puede variar entre 10-90% dependiendo de las condiciones empleadas en el tratamiento térmico.

A partir de la harina de soja desgrasada pueden elaborarse otros productos ricos en proteínas tales como los concentrados y aislados proteicos previamente mencionados. Ambos productos difieren en su contenido de proteína y en los métodos utilizados para separar y concentrar las mismas.

Los concentrados proteicos pueden obtenerse a escala comercial mediante tres métodos: - eliminación de los constituyentes no proteicos mediante extracción con alcohol al 60-80%. El precipitado remanente (proteínas y carbohidratos) es posteriormente desolventizado y secado para obtener el concentrado; - insolubilización de las principales proteínas de soja por extracción con ácido diluido a pH 4,5; - extracción acuosa de la harina de soja previamente calentada para desnaturalizar las proteínas e insolubiliarlas. Dado que las condiciones empleadas en estos tres métodos difieren entre sí, las características de los productos obtenidos también son distintas, especialmente el porcentaje relativo de sus componentes y su solubilidad en agua, la cual no supera el 35% en el mejor de los casos (lavado isoelectrico). El contenido total de proteínas de estos productos es 70% expresado en base seca.

Se conoce un cuarto método de obtención de concentrados proteicos de soja el cual no es usado a nivel industrial. El mismo se basa en la extracción de harina desgrasada con agua en el punto isoeléctrico de las principales proteínas (pH 4,6). El precipitado obtenido es neutralizado y posteriormente secado. Para mejorar las propiedades del producto el concentrado es sometido a un tratamiento térmico suave hasta obtener un fluido traslúcido viscoso el que es posteriormente secado obteniéndose un producto con alta solubilidad (Sair, 1959).

Los concentrados proteicos de soja poseen no sólo un mayor contenido de proteínas que la harina de partida sino también mejores características pues se eliminan los carbohidratos, responsables del sabor a poroto y de los problemas de flatulencia.

La producción comercial de aislados proteicos de soja para uso industrial comenzó en Estados Unidos de Norteamérica a mediados de 1930 mientras que la obtención de productos para consumo humano data de 1959. La tecnología de producción de los mismos es compleja y frecuentemente se encuentra protegida por patentes, existiendo además numerosas variantes. En términos generales la elaboración de este tipo de productos involucra, como primera etapa, la extracción acuosa de las proteínas de la harina de soja desgrasada a pH neutro o alcalino. Seguidamente las proteínas solubilizadas se precipitan por agregado de ácido hasta pH 4,6 (pH isoeléctrico). El sobrenadante remanente, luego de la sedimentación de las proteínas, contiene hidratos de carbono, sales y componentes menores. El precipitado obtenido es seguidamente lavado, neutralizado con NaOH y secado (Ohren, 1981). El producto resultante contiene 90-95% de proteínas, 2-4% de cenizas y 3-5% de componentes minoritarios (saponinas, fosfolípidos, glicósidos, isoflavonas y componentes no identificados (Nash y col., 1967; Pearson, 1976).

Los aislados proteicos destinados al consumo humano se preparan haciendo uso del mínimo de modificaciones químicas para evitar la pérdida de

aminoácidos y de valor nutricional. Sin embargo, la obtención de productos con propiedades funcionales específicas requiere el uso de ciertos tratamientos químicos, térmicos o enzimáticos, previos a la etapa de secado (Ohren, 1981).

Por último debemos considerar las proteínas texturizadas de soja. Estos productos se pueden obtener por extrusión de harina o concentrados proteicos y mediante "hilado" de aislados proteicos.

- en el caso de la extrusión termoplástica la harina o el concentrado hidratado (10-30% de agua) se expone a alta presión (10.000-20.000 KPa) y alta temperatura. Por un período corto (20-150 seg) la temperatura de la mezcla se eleva a 150-200°C a efectos de obtener una consistencia viscosa e inmediatamente se extruda a través de una malla a un medio a presión normal. De esta manera se obtiene una matriz altamente expandida constituida por fibras orientadas en la dirección del flujo. Cuando esta matriz es rehidratada se obtiene una estructura esponjosa, fibrosa y parcialmente elástica.
- para la formación de fibras se requiere partir de un aislado proteico. Inicialmente se prepara una solución a alta concentración proteica (10-40%) a pH 10, la cual se desgasea y clarifica. Seguidamente se pasa a través de una placa con orificios de 50-150  $\mu\text{m}$  de diámetro, obteniéndose la formación de "filamentos" líquidos que se reciben en un medio salino (NaCl)-ácido. Las fibras de proteína coagulada son pasadas a través de cilindros rotatorios permitiéndose un mejor alineamiento e interacción entre las cadenas polipeptídicas.

Cabe señalar que existen otros productos alimenticios derivados de la soja además de los anteriormente mencionados. Desde hace cientos de años en los países orientales se elaboran productos fermentados a partir del poroto cocido tales como tempe, miso y nato (Fukushima, 1979), así como productos



obtenidos a partir del poroto entero como la leche de soja, la cual se emplea para la fabricación de tofu, yogurt (Fukushima, 1981).

En nuestro país el espectro de productos elaborados en base a soja es reducido y los mismos no son de consumo masivo. Actualmente, por ejemplo, no se producen concentrados y aislados proteicos, debiendo ser importados. En los países de la región se destaca el caso de Brasil el cual no sólo es el segundo productor mundial de soja sino que posee una industria consolidada que elabora y exporta numerosos productos tales como aceite, lecitina, harina, aislados y concentrados proteicos, proteína texturizada, mayonesa, margarina, etc. (Turatti y Canto, 1989). Además, ha desarrollado programas institucionales para la alimentación de niños basados en el uso de proteínas de soja que incrementan el valor nutricional de los alimentos (Turatti y Canto, 1989).

### **1.6. USO DE LAS PROTEINAS DE SOJA**

Las proteínas de soja, bajo las formas descriptas previamente, pueden emplearse para la elaboración de numerosos productos alimenticios tales como productos panaderos, sopas, bebidas, productos en base a carne vacuna, pollo o pescado, productos simil-lácteos, etc.

En el caso específico de los aislados proteicos su alto contenido de proteínas (mínimo 90% expresado en base seca) y su buena calidad nutricional (índice de eficiencia proteica, PER = 1,8) hace que se los considere excelentes ingredientes para aumentar el contenido de proteínas y el valor nutricional de alimentos formulados. A este hecho se debe agregar la flexibilidad de las proteínas presentes en los aislados de soja para otorgar características funcionales comparables a las de proteínas tradicionales (carne, leche, huevos) a los productos que las contienen. Por ello se las

ha comenzado a emplear en alimentos formulados reemplazando en mayor o menor extensión a las proteínas de origen animal.

Tradicionalmente los aislados proteicos de soja se emplearon en fórmulas destinadas a niños con problemas alérgicos frente a las proteínas presentes en la leche de vaca. Con el correr del tiempo y vista su funcionalidad su espectro de uso se ha ampliado. Así, por ejemplo los aislados proteicos pueden ser utilizados para emulsificar grasa y agua, formar geles en frío a altas concentraciones o sustituir proteínas de carne solubles en medio salino.

Aquellos aislados proteicos con bajo índice de nitrógeno soluble (NSI) pueden a su vez utilizarse para absorber agua y grasa, en alimentos para niños y en productos sin sabor.

Asimismo se emplean como agentes espumantes, especialmente si se los ha sometido a tratamientos enzimáticos.

Con ciertos procesamiento adicionales son también aptos para enriquecer, desde el punto de vista nutricional, bebidas carbonatadas y jugos de frutos.

De lo expuesto surge claramente que las proteínas de soja, en sus distintas formas, pueden emplearse como ingredientes de muy variados productos otorgando características funcionales específicas. A modo de resumen se esquematizan algunas de estas posibilidades:

Propiedad funcional	Forma de proteína empleada	Tipo de alimento
viscosidad	harina, concentrados, aislados	sopa, salsas
gelificación	aislados	símil carne picada
formación de fibras	aislados	símil carne
formación de masa	harina, concentrados, aislados	productos panaderos
formación de films	aislados	salchichas
adhesión	concentrados, aislados	salchichas, hamburguesas, jamón, carne deshidratada, otras carnes
cohesión	harina, aislados	productos panaderos, fideos, símil carne
control de color	harina	pan, waffles
formación de emulsiones	harina, concentrados, aislados	salchichas, pan, tortas, sopa, postres congelados
absorción de grasa	harina, concentrados, aislados	salchichas, hamburguesas productos panaderos
absorción de agua	harina, concentrados, aislados	pan, tortas, fideos, confituras
elasticidad	aislados	productos panaderos
aireación	aislados	confituras, coberturas

Foods and Food Production Encyclopedia (1982).

1.7. FUNCIONALIDAD PROTEICA

Las propiedades funcionales denotan las características que gobiernan a las proteínas en los alimentos durante su procesamiento, almacenamiento y preparación afectando la calidad y aceptación de los mismos (Hermansson,

1979). En un sentido amplio la funcionalidad es cualquier propiedad de las proteínas, distinta del valor nutricional, que afecta su utilización.

De acuerdo a Cheftel y col. (1985) las propiedades funcionales de las proteínas en los alimentos se pueden clasificar en tres grupos:

- propiedades de hidratación, dependientes de las interacciones proteína-agua
- propiedades de superficie
- propiedades relacionadas con las interacciones proteína-proteína

Dentro del primer grupo se pueden incluir a las propiedades de absorción y retención de agua, humectabilidad, dispersibilidad, adhesión, solubilidad y viscosidad. El segundo grupo relaciona primariamente las características de tensión superficial, espumante y de emulsificación de las proteínas; en tanto que el tercer grupo incluye propiedades reológicas tales como capacidad de gelificación y de formación de estructuras (masa, fibras, etc.).

Cabe señalar que estos tres grupos no son totalmente independientes.

Las propiedades funcionales de una proteína están fundamentalmente relacionadas con sus características físicas, químicas y estructurales, que incluyen forma, tamaño, composición y secuencia aminoacídica, cantidad y distribución de la carga, relación hidrofobicidad-hidrofilicidad, estructura secundaria, terciaria y cuaternaria, uniones inter e intracatenarias, rigidez-flexibilidad molecular. Numerosos factores externos los cuales incluyen factores ambientales (agua, iones, pH, temperatura, agentes oxidantes-reductores, componentes no proteicos) así como condiciones de aislamiento y procesamiento (tratamientos térmicos, pH, sales, secado, modificaciones químicas y físicas, agentes reductores-oxidantes) alteran la funcionalidad proteica (Kinsella y Damodaran, 1981; Damodaran, 1989). Estas alteraciones, sin embargo, no son más que manifestaciones de los cambios en la

estructura-conformación de la proteína ocasionados por los factores externos mencionados.

Recién en la última década los estudios de investigación se han orientado hacia la búsqueda de las relaciones existentes entre estructura y funcionalidad de las proteínas. En ese sentido se ha estudiado el comportamiento de diversas proteínas: actomiosina, caseína, ovoalbúmina, proteínas de avena, soja, etc. Si bien hay algunos parámetros fisicoquímicos válidos más allá del tipo de proteína, tal como el rol de la hidrofobicidad superficial en las propiedades emulsificantes o en el espumado (Kato y Nakai, 1980), se conocen otras características propias de cada sistema. Entre estas últimas se puede mencionar la capacidad de gelificación; para ciertas proteínas la formación de puentes disulfuro intercatenarios durante la gelificación es crucial, mientras que para otras las interacciones de tipo no-covalente son determinantes (Schmidt y Morris, 1984).

En el caso específico de las proteínas de soja se han realizado una gran cantidad de estudios. Muchos de ellos han estado dirigidos a obtener respuestas sobre el proceso de gelificación. Los resultados existentes indican la necesidad de un tratamiento térmico para la formación del gel. De acuerdo a Saio y col. (1974) la fracción 7S requiere un calentamiento a 70°C y la fracción 11S a 90°C. Estas temperaturas estarían relacionadas con las temperaturas de desnaturalización de ambas proteínas, que son 76°C y 91°C, respectivamente (Hermansson, 1978). Las características de los geles obtenidos en los dos casos son diferentes; así por ejemplo, los geles formados por glicinina (11S) poseen mayor capacidad de retención de agua y son más duros y elásticos que los correspondientes a  $\beta$ -conglucina (7S). Estas diferencias han sido atribuidas al tipo de estructuras que exhiben estas proteínas, lo que determina diferencias en las reacciones de disociación-asociación y de desplegamiento de las cadenas polipeptídicas por efecto térmico (Babajimopoulos y col., 1983). Cuando las globulinas 7S y 11S se

calientan en forma conjunta se observó la formación de grandes complejos solubles constituidos por las subunidades  $\beta$  de  $\beta$ -conglucina y el polipéptido B de la glicina. En la asociación de dichas subunidades intervienen principalmente interacciones electrostáticas, aunque algunos polipéptidos básicos interaccionan a través de la formación de puentes disulfuro (Damodaran y Kinsella, 1982a; Utsumi y col., 1984; Utsumi y Kinsella, 1985a). Estos complejos solubles probablemente correspondan al estado de progel descrito por Catsimpoolas y Meyer (1970). Luego del enfriamiento el progel se transforma en gel.

Se ha observado que diferencias en el modo de preparación de las globulinas 7S y 11S conducen a la obtención de geles con diferentes características (Saio y Watanabe, 1978; Shimada y Matsushita, 1980; Utsumi y Kinsella, 1985b).

Con referencia a las propiedades emulsificantes, Aoki y col. (1980) han encontrado que fracciones proteicas ricas en 7S son superiores a las fracciones ricas en 11S, en términos de capacidad de emulsificación y estabilidad de la emulsión formada. La hidrólisis parcial de ambas globulinas, 7S y 11S, mejora su comportamiento en la emulsificación en el rango de pH de 3-8.

En general, a través de distintos estudios, se han puesto de manifiesto mejores propiedades de superficie (espumante y emulsificante) en el caso de la fracción  $\beta$ -conglucina (Kato y col., 1983a; Yamauchi y col., 1982).

Kato y col. (1983b) observaron que la hidrofobicidad superficial de la  $\beta$ -conglucina aumenta con el tratamiento térmico y produce un incremento en la capacidad espumante pero no mejora sustancialmente la estabilidad de la espuma.

La variación de la solubilidad con el pH de las dos fracciones proteicas mayoritarias de la soja (7S y 11S) también es diferente, mientras a

pH 6,4 y a baja fuerza iónica la glicinina es insoluble, la  $\beta$ -conglucininina permanece mayoritariamente en solución. Esta diferencia fue aprovechada por Thanh y Shibasaki (1976a, 1977) para purificar las principales proteínas del poroto de soja.

Dado el diferente comportamiento mostrado por las fracciones 7S y 11S, Nakamura y col. (1986) sugirieron la posibilidad de controlar las propiedades funcionales de productos basados en estas proteínas regulando la concentración y la proporción relativa de ambas fracciones en los mismos.

### **OBJETIVOS**

El presente estudio está dirigido a obtener información básica sobre el rol que cumplen las características fisicoquímicas y estructurales de las proteínas de soja y las interacciones que se establecen entre ellas y con el medio que las rodea en la expresión de su funcionalidad. Ello contempla evaluar una serie de propiedades fisicoquímicas y funcionales de un conjunto de aislados proteicos de origen comercial y establecer las relaciones existentes entre ellas. Se intenta además determinar la incidencia del tratamiento térmico y de la presencia de iones calcio sobre la funcionalidad de aislados proteicos obtenidos en el laboratorio. Asimismo, se pretende analizar el proceso de desnaturalización por calor de las proteínas 7S y 11S parcialmente purificadas y de aislados proteicos preparados en el laboratorio y determinar los parámetros cinéticos asociados al mismo.



**MATERIALES**  
**Y**  
**MÉTODOS**

2.1. AISLADOS Y FRACCIONES PROTEICAS UTILIZADAS

2.1.1. Aislados proteicos de soja de origen comercial

En este estudio se emplearon 23 aislados proteicos de soja elaborados por tres industrias: Sanbra S.A. (Brasil), Ralston Purina Co. (Estados Unidos) y Ardex (Francia).

A continuación se indica el nombre comercial de cada aislado y la numeración que se empleó en este trabajo para identificar a cada uno de ellos.

Aislado	Nombre comercial	Lote	Aislado	Nombre comercial	Lote
1	Proteimax 90LG	1	13	Samprosoy HG-2	-
2	Proteimax 90LG	2	14	Samprosoy MP-1	-
3	Proteimax 90LG	3	15	Samprosoy MP-2	-
4	Proteimax 90LG	4	16	Proteimax LV	-
5	Proteimax 90LG	5	17	Supro 500 E	1
6	Proteimax 90HG	1	18	Supro 500 E	2
7	Proteimax 90HG	2	19	Supro 610	-
8	Proteimax 90HG	3	20	Supro 515	-
9	Proteimax 90HG	4	21	Supro 590	-
10	Proteimax 90HG	5	22	Samprosoy 90NB	-
11	Proteimax 90HG	6	23	Ardex F	-
12	Samprosoy HG-1	-			

Durante la realización del estudio las muestras se almacenaron en cámara a 4°C en bolsas de polietileno cerradas.

### 2.1.2. Aislados proteicos de soja obtenidos en el laboratorio

#### 2.1.2.1. Procedimiento básico de obtención de aislados proteicos de soja

Los aislados proteicos de soja se obtienen a partir de harina desgrasada. El procedimiento básico de obtención consta de cuatro etapas (Ohren, 1981):

Etapa 1: Solubilización de proteínas

Etapa 2: Precipitación ácida o isoelectrica

Etapa 3: Resuspensión del precipitado y neutralización

Etapa 4: Secado del proteinato

Las condiciones empleadas en este trabajo para la preparación de aislados proteicos de soja a nivel de laboratorio fueron las siguientes:

Etapa 1: Se mezcló harina desgrasada de soja con agua alcalina (pH = 8,0 con NaOH 0,2 N), manteniéndose la mezcla agitada magnéticamente durante 1 h a temperatura ambiente. El residuo sólido se separó por centrifugación a 10.000 rpm durante 20 min a 5°C, empleando una centrífuga Sorvall RC-5B con rotor GSA.

Etapa 2: El extracto acuoso se llevó a temperatura ambiente a pH 4,5 con HCl 0,2 N, pH al cual la solubilidad proteica es mínima. El precipitado obtenido se separó por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min a 5°C (centrífuga Sorvall RC-5B, rotor GSA).

Etapa 3: Las proteínas precipitadas se resolubilizaron a temperatura ambiente llevando nuevamente a pH 8 con NaOH 0,2 N.

Etapa 4: El proteinato de sodio obtenido se liofilizó en un liofilizador Thermo vac, Industries Corp. Las proteínas liofilizadas se molieron en molinillo analítico Teckmar modelo A-10 hasta obtener un polvo fino.

Las distintas partidas de harina desgrasada de soja empleadas fueron cedidas por Sanbra S.A. y corresponden a la materia prima por ellos utilizada en la elaboración de aislados comerciales.

### **2.1.2.2. Modificaciones efectuadas al procedimiento básico**

En la preparación de los aislados proteicos de laboratorio se efectuaron una serie de modificaciones en la primer etapa correspondiente a la solubilización proteica.

#### **a) Relación harina:agua**

Se prepararon distintos aislados proteicos de soja empleando dos relaciones harina:agua 1:10 y 1:20 (p/v).

#### **b) pH de extracción**

La extracción en medio acuoso de las proteínas a partir de harina desgrasada se efectuó a temperatura ambiente a tres pHs diferentes, pH 7, 8 y 9, manteniendo constante la relación harina:agua 1:20 (p/v).

#### **c) Reextracciones sucesivas**

Se prepararon aislados proteicos de soja empleando una relación de extracción agua:harina de 1:20 (p/v) en dos etapas. En la primera se llevó a cabo la extracción con una relación harina:agua alcalina de 1:10 (p/v) durante 1 h a temperatura ambiente con agitación. Se separó el residuo sólido por centrifugación, utilizando las condiciones anteriormente mencionadas y sobre éste se efectuó una segunda extracción equivalente a la primera. Finalmente se reunieron ambos sobrenadantes.

### d) Tratamiento térmico

Se obtuvieron aislados de soja cuyas proteínas fueron solubilizadas en agua alcalina, pH 8, a 50°C, utilizando un baño de agua termostatzado con agitación. La relación de extracción harina:agua empleada fue 1:20 (p/v).

### 2.1.2.3. Modificaciones de los aislados proteicos de soja obtenidos en el laboratorio

#### a) Tratamiento térmico

Soluciones acuosas al 5% (p/v) de proteinato de sodio fueron tratadas térmicamente en baño de agua termostatzado con agitación permanente.

Los tratamientos térmicos realizados fueron:

- 30 min a 20°C, 40°C, 60°C, 77°C y 100°C
- 60 min a 20°C, 50°C, 70°C, y 90°C
- 20 min, 45 min, 100 min, 240 min y 360 min a 90°C.

Todas las muestras obtenidas se liofilizaron como se indicó previamente.

#### b) Tratamiento térmico a distintas concentraciones de proteínas

Se prepararon soluciones al 3%, 8% y 13% (p/v) de proteinato de sodio en agua. Las mismas se trataron térmicamente durante 100 min a 90°C en baño de agua como ya se indicó, siendo seguidamente liofilizadas.

#### c) Agregado de calcio

##### i) Cloruro de calcio

Se prepararon alícuotas de 50 ml de soluciones al 3% (p/v) de proteinato de sodio en agua, a las que se les agregó distintas canti-

dades de  $\text{CaCl}_2$  sólido. Se controló el pH y cuando fue necesario se volvió a llevar a pH 8 con NaOH 0,1N. Luego las soluciones se trataron térmicamente durante 100 min a 90°C como se indicó previamente y se liofilizaron.

Las cantidades de  $\text{CaCl}_2$  agregadas fueron las siguientes: 28 mg, 44 mg, 55 mg, 66 mg, 83 mg, 100 mg y 122 mg.

### ii) Hidróxido de calcio

Se preparó un precipitado ácido de proteínas de soja el que se separó en alícuotas de 10 g. A cada una de ellas se agregó una cantidad determinada de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  sólido y luego se resuspendieron las proteínas llevando a pH 8 con NaOH 0,1N. Para una cantidad dada de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  se prepararon dos alícuotas, una de las cuales se trató térmicamente durante 100 min a 90°C. Todas las soluciones obtenidas fueron liofilizadas.

Las cantidades de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  agregadas a 10 g (peso húmedo) de precipitado isoelectrico fueron las siguientes: 11,1 mg, 20,0 mg, 30,0 mg, 40,0 mg, 55,5 mg, 70,5 mg, 85,0 mg y 100,0 mg.

### 2.1.3. Obtención de las proteínas $\beta$ -conglucina (7S) y glicina (11S)

La purificación parcial de las proteínas 7S y 11S se realizó de acuerdo al protocolo de Thanh y Shibasaki (1976a) indicado a continuación en forma esquemática:

```

graph TD
    A[harina desgrasada] --> B[agregar buffer 1 (1:20, p/v), agitar 1 h, 20°C]
    B --> C[centrifugar 10,000 rpm - 20 min - 20°C (rotor GSA, centrífuga Sorvall RC-5B)]
    C --> D[ajustar a pH 6,4 con HCl 2N]
    D --> E[centrifugar 10.000 rpm - 20 min - 2-5°C (rotor GSA, centrífuga Sorvall RC-5B)]
    E --> F[precipitado  
fracción 11S]
    E --> G[sobrenadante  
fracción 7S + suero]
    F --> H[lavar con Tris-HCl 0,03M pH 6,4]
    H --> I[disolver en buffer 1  
hasta 2-3% de proteína]
    I --> J[dejar la solución a 3-5°C  
durante la noche]
    J --> K[Centrifugar a 10.000 rpm - 20 min - 2-5°C  
(rotor SS34, centrífuga Sorvall RC-5B)]
    K --> L[sobrenadante]
    L --> M[dializar contra agua destilada a 4°C durante 24 hs]
    M --> N[liofilizar]
    N --> O[Glicinina (11S)]
    G --> P[llevar a pH 4,8 con HCl 0,2N]
    P --> Q[centrifugar 10.000 rpm  
20 min 2-5°C  
(rotor GSA, centrífuga Sorvall RC-5B)]
    Q --> R[resuspender el precipitado  
en buffer 1 durante la noche]
    R --> S["β-conglicinina (7S)"]
  
```

28

### **2.1.4. Obtención de los aislados proteicos de soja empleados en el estudio de la cinética de desnaturalización térmica**

Se obtuvo un aislado proteico de soja en el laboratorio aplicando las siguientes condiciones:

- relación harina:agua = 1:20 (p/v).
- pH de extracción = pH 8. Se empleó NaOH 0,2 N para llevar al pH indicado.
- resuspensión del precipitado isoelectrico: el precipitado obtenido se llevó a pH 8 con NaOH 0,2 N.

La solución de proteínas obtenida se dializó contra agua destilada durante 24 hs en cámara a 4°C y luego se liofilizó.



### 2.2. COMPOSICION QUIMICA DE LOS AISLADOS PROTEICOS DE SOJA ESTUDIADOS

#### 2.2.1. Determinación del contenido de proteína total

El contenido de proteína total de los aislados proteicos de soja se determinó dosando la cantidad de nitrógeno total de las muestras mediante el método de Kjeldahl (AOAC, 1945). Se utilizó un equipo Büchi 427 compuesto por una unidad digestora (Büchi 427) y una de destilación (Büchi 320). Para calcular el porcentaje de proteína total se usó el factor de conversión 6,25.

$$\% \text{ Proteínas} = \% \text{ N} \times 6,25.$$

Cabe mencionar que el factor 6,25 es el usado habitualmente para proteínas de soja a pesar que el factor específico es 5,7.

Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de aislado (% p/p).

#### 2.2.2. Determinación del contenido de cenizas

Para realizar esta determinación se colocaron 3 g de muestra en un crisol de porcelana previamente calcinado y tarado. La muestra se calentó sobre tela metálica hasta residuo negro. Luego se llevó a mufla y se calcinó a 600°C hasta cenizas blancas. El contenido de cenizas se calculó por diferencia de peso y el valor se expresó como porcentaje de aislado (% p/p).

### 2.2.3. Determinación de humedad

2-3 g de las muestras estudiadas se calentaron a 120°C durante 2 h en estufa de aire. El contenido de humedad se calculó por diferencia de peso, expresándose el valor obtenido como porcentaje de aislado (% p/p).

### 2.2.4. Determinación de iones

En distintas muestras de aislados proteicos de soja comerciales y obtenidos en el laboratorio se determinó el contenido de: sodio, calcio, magnesio, fósforo y potasio.

El análisis de Na, Ca, Mg y P se realizó mediante la técnica de espectrometría de emisión con plasma de argón, mientras que la determinación de K se efectuó por espectrometría de absorción atómica.

#### 2.2.4.1. Preparación de la muestra

Las cenizas obtenidas como se indicó previamente (punto 2.2.2) se disolvieron en 5 ml de HCl concentrado. Luego se llevaron con agua destilada a un volumen final de 100 ml.

#### 2.2.4.2. Espectrometría de emisión con plasma de argón

Se empleó un espectrómetro de emisión de plasma de argón acoplado por inducción marca IL modelo 300, de lectura secuencial y media resolución espectral (20 pm).

Las condiciones operacionales fueron las siguientes:

velocidad de flujo de argón (l/min): gas externo 13, gas transportador 1 y gas auxiliar 0,5.

altura de observación (mm): 14 (Mg y P), 12 (Ca) y 2 (Na).

longitud de onda (nm): 422,67 (Ca), 383,82 (Mg), 589,59 (Na) y 213,62 (P)

Para cuantificar los iones determinados se emplearon curvas de calibración realizadas con compuestos puros respetando la acidez de las muestras problemas.

### 2.2.4.3. Espectrometría de absorción atómica

El equipo empleado fue un espectrómetro de absorción atómica marca Metrolab, modelo 250 AA con lámpara de cátodo hueco de potasio marca Hamamatsu Photonics KK y mechero para llama aire-acetileno con cámara de premezclado.

Las condiciones operacionales fueron las siguientes:

longitud de onda (nm): 766,5

corriente de lámpara (mA): 8

ranura monocromador ( $\mu\text{m}$ ): 50

tipo de llama: aire acetileno

caudal (l/min): 9,40 (comburente), 1,90 (combustible)

altura de observación: base mechero

Para cuantificar el potasio presente en los aislados se empleó una curva de calibración realizada con un compuesto puro respetando la acidez de las muestras problema.

### 2.2.5. Análisis de lípidos

#### 2.2.5.1. Extracción de los lípidos

Los lípidos de los aislados proteicos de soja fueron extraídos con una mezcla de cloroformo:metanol (2:1, v/v) de acuerdo al procedimiento de Folch y col. (1957), empleando una relación de 1 g de aislado para 8 ml del reactivo de extracción. La mezcla resultante, luego de agitación vigorosa, se filtró a través de papel, el que se lavó después de la filtración con cloroformo:metanol (2:1, v/v) para evitar pérdidas del extracto lipídico. Al filtrado se le agregó un 20% de su volumen de agua destilada, se agitó y se dejó decantar a 4°C para permitir la separación de las fases: una superior metanólica-acuosa y una inferior clorofórmica. La fase superior se desechó por sifonación y la inferior se llevó a seco hasta peso constante con corriente de nitrógeno. El contenido de lípidos totales se expresó como porcentaje de aislado (% p/p).

#### 2.2.5.2. Cromatografía en columna de ácido silícico

Los lípidos neutros y polares se separaron en una columna de ácido silícico previamente activado 24 horas a 120°C en éter de petróleo conteniendo 1% de éter etílico. El extracto de lípidos totales suspendido en 1 ml de éter de petróleo se sembró en la columna (1 cm diámetro interno por 8 cm de alto de lecho). Los lípidos neutros se eluyeron con cloroformo y los lípidos polares se separaron por lavado del relleno con metanol.

La cuantificación se realizó gravimétricamente evaporando el solvente con nitrógeno hasta peso constante. Los contenidos de lípidos neutros y polares se expresaron como porcentaje de los lípidos totales (% p/p).

### 2.2.5.3. Cromatografía en capa delgada

La composición de los lípidos, tanto neutros como polares, se determinó por cromatografía en capa delgada, utilizando placas de vidrio de 20 x 20 cm y sílica gel H como fase estacionaria, con un espesor de 500  $\mu\text{m}$ . Las placas se activaron, inmediatamente antes de su uso, durante 1 h a 120°C. Las muestras lipídicas se disolvieron en cloroformo y se sembraron en la placa en forma puntual.

Para la separación de lípidos neutros se utilizó una fase móvil constituida por hexano:éter etílico:ácido acético (80:20:1, v/v/v) y para la separación de los lípidos polares otra compuesta por cloroformo:metanol:agua (65:25:4, v/v/v).

Las placas, una vez desarrolladas, se secaron y se revelaron por carbonización de acuerdo a Blank y col. (1964). Para ello se rociaron con una solución de  $\text{H}_2(\text{SO}_4)$  al 70% en una solución de  $\text{K}_2(\text{Cr}_2\text{O}_7)$  saturada que previamente se filtró a través de lana de vidrio. Luego las placas se calentaron en estufa a 140°C durante 2 horas. La densitometría se realizó empleando un densitómetro Zeiss PMQII.

Para identificar los componentes individuales se sembraron simultáneamente estándares adecuados y se compararon los  $R_f$ .

Para cuantificar los distintos componentes se utilizó una curva de calibración que se realizó para cada lípido en particular sembrando el estándar respectivo en distintas cantidades. Los resultados se expresaron como porcentaje.

### 2.2.6. Determinación del contenido de grupos sulfhidrilos libres y totales

El contenido de grupos sulfhidrilos (SH) libres y totales presentes en las proteínas de los aislados proteicos de soja se determinó usando el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico, DTNB) de acuerdo a los procedimientos de Beveridge y col. (1974) y de Li-Chan (1983) con ligeras modificaciones.

**Grupos SH libres:** 60 mg de muestra fueron solubilizados en 10 ml de buffer 0,086M Tris - 0,009M glicina - 0,004M EDTA (pH 8) conteniendo 8M de urea (buffer urea). Luego de centrifugar en una centrífuga Sorvall RC-5B, rotor SS34, a 10.000 rpm, durante 20 min a 4°C, se tomaron alícuotas de 1 ml que se mezclaron con 40 µl de solución de DTNB en metanol (4 mg/ml). Diez minutos después de la adición y mezclado del reactivo con la muestra, por inversión rápida, se leyó la absorbancia a 412 nm. Se incluyeron para cada determinación blancos de reactivo y de muestra.

**Grupos SH totales:** 20 mg de muestra fueron solubilizados en 4 ml de buffer urea conteniendo 2% de 2-mercaptoetanol. Después de una incubación de 2 h a temperatura ambiente se tomaron alícuotas de 3 ml a las que se agregó 1 ml de solución al 50% de ácido tricloroacético (TCA). Después de una incubación adicional a temperatura ambiente de 1 h, las muestras fueron centrifugadas a 5.000 rpm (centrífuga Sorvall RC-5B, rotor SS34) durante 15 min a 4°C. Los precipitados fueron resuspendidos en 3 ml de TCA 12,5% y posteriormente centrifugados a 5.000 rpm (centrífuga Sorvall RC-5B, rotor SS34) durante 15 min a 4°C. Luego de repetir cuatro veces este último paso, los precipitados obtenidos se disolvieron en 10 ml de buffer urea. A continuación se determinó el contenido de grupos SH totales en alícuotas de 1 ml siguiendo el procedimiento detallado anteriormente.

En ambos casos la concentración de proteínas se determinó por el método de Biuret (Gornall y col., 1949).

Para estimar el coeficiente de extinción se realizó una curva de calibración con una solución de  $2 \times 10^{-3}M$  de cisteína en buffer urea. Alícuotas de 10 hasta 100  $\mu l$  de cisteína se diluyeron hasta 1 ml con buffer urea. Luego se realizó la reacción colorimétrica como ya se indicó. El valor del coeficiente de extinción molar obtenido fue  $13.100 M^{-1}cm^{-1}$  el cual concuerda con el valor de bibliografía (Ellman, 1959).

En todos los casos las determinaciones se hicieron por duplicado. Los resultados, promedio de las determinaciones realizadas, se expresaron en micromoles de SH por gramo de proteína total del aislado.

### 2.3. DETERMINACION DE PROPIEDADES FISICOQUIMICAS EN LOS AISLADOS DE PROTEINAS DE SOJA ANALIZADOS

#### 2.3.1. Hidrofobicidad

Inicialmente la hidrofobicidad total de las proteínas se calculaba a partir de la suma de las hidrofobicidades de los residuos de los aminoácidos constituyentes, en base a la escala de hidrofobicidades propuesta por Tanford (1962). Más adelante, Keshavara y Nakai (1979) utilizaron el término hidrofobicidad efectiva para referirse a la hidrofobicidad superficial de la molécula proteica, la cual puede ser determinada por diversas técnicas (Clarke y Nakai, 1972; Melander y Horvath, 1977; Sklar y col., 1977; Horiuchi y col., 1978; van Oss y col., 1979).

Para este estudio se escogió la técnica desarrollada por Sklar y col. (1977) la cual fue aplicada al estudio de proteínas por Kato y Nakai (1980). La misma se basa en el hecho que ciertos fluoróforos, tales como el ácido cis-parinárico y el ácido 8-anilino-1-naftalen sulfónico (ANS), cuando se inmovilizan en superficies hidrofóbicas aumentan su rendimiento

cuántico. Por lo tanto, la determinación de la extensión de la unión del fluoróforo a las proteínas, en determinadas condiciones experimentales, constituye una medida de la hidrofobicidad de las mismas. Esta última se designa "hidrofobicidad efectiva" o más comúnmente "hidrofobicidad superficial o  $S_0$ ".

Hayakawa y Nakai (1985) distinguieron entre hidrofobicidad alifática y aromática según el tipo de fluoróforo empleado. El ácido cis-parinámico tiene una cadena hidrocarbonada alifática, la que tiene mayor afinidad por residuos de este tipo; en este caso por lo tanto la hidrofobicidad determinada será la alifática. Mientras el ANS que posee grupos aromáticos dará cuenta preferentemente de la hidrofobicidad aromática.

Este método puede ser aplicado para determinar la hidrofobicidad superficial de proteínas solubles, no así la de proteínas insolubles. Para este último caso, Kato y col. (1984) desarrollaron un método basado en la capacidad de las proteínas de unir dodecil sulfato de sodio (SDS) aplicado en muy baja concentración, 0,07 mM, la cual es 1/40 parte de la concentración micelar crítica (Steinhardt y col., 1977).

### 2.3.1.1. Determinación de la hidrofobicidad superficial

Preparación de las muestras: 200 mg de aislado proteico se mezclaron con 6 ml de buffer fosfato 0,01M pH 7 y se mantuvo durante 1 h a temperatura ambiente con agitación magnética. Luego se centrifugó a 10.000 rpm (centrífuga Sorvall RC-5B, rotor SS34) durante 10 min a 2-5°C y se recogió el sobrenadante. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951). La determinación de la hidrofobicidad superficial se realizó usando ANS como marcador fluorescente midiéndose la intensidad de fluorescencia en un equipo Perkin-Elmer Model 2000. En la cubeta se colocaron 3 ml de buffer fosfato 0,01M pH 7 y 15  $\mu$ l de una solución de



ANS 8,0mM en buffer fosfato 0,01M pH 7. La solución de proteínas se fue agregando en alícuotas. Luego de cada agregado se leyó la intensidad de fluorescencia. Las alícuotas se seleccionaron para obtener en la cubeta concentraciones de proteínas entre 0,08% y 0,30%. La longitud de onda de excitación utilizada fue 364 nm y la de emisión 487 nm. Esta se determinó en base al espectro de emisión del ANS en metanol, siendo 487 nm la longitud de onda donde se obtuvo la máxima intensidad de fluorescencia.

La intensidad de fluorescencia neta para cada concentración de proteína se determinó sustrayendo a la intensidad leída la suma del valor de la intensidad de cada muestra sin el fluoróforo, más el valor de la intensidad del fluoróforo en buffer fosfato 0,01M pH 7.

La hidrofobicidad superficial ( $S_0$ ) de la proteína se calculó de la pendiente inicial del gráfico de intensidad de fluorescencia neta en función de la concentración de proteína expresada en g%. Los resultados presentados son el promedio de dos determinaciones.

### 2.3.1.2. Determinación de la hidrofobicidad superficial de las proteínas totales

La hidrofobicidad de las proteínas totales de los aislados proteicos de soja fue determinada, como ya se señaló, de acuerdo a la técnica de Kato y col. (1984). Para ello se separaron 10 mg de aislado y se mezclaron con 5 ml de SDS 0,07mM. Las mezclas se dejaron en reposo durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se dializaron a igual temperatura contra 25 volúmenes de buffer fosfato 0,01M, pH 7, durante 24 h.

El contenido de SDS del dializado se determinó por el método de Epton (1948). En un tubo se colocaron 0,5 ml de dializado que se mezcló con 2,5 ml de  $\text{CHCl}_3$ . Luego se agregaron 60  $\mu\text{l}$  de solución de azul de metileno 0,024%. Después de mezclar por inversión durante 1 min, se centrifugó, a

temperatura ambiente, en centrífuga Rolco modelo 2036 a 2.500 rpm para separar las fases. Se recogió la fase inferior que contiene la mezcla SDS-azul de metileno y se leyó la absorbancia a 655 nm.

La curva de calibración se realizó con solución de SDS 0,07mM. Se tomaron alícuotas de 50 a 500  $\mu$ l que se llevaron a 0,5 ml con agua destilada. Luego se continuó con el procedimiento indicado. La determinación de la concentración de proteínas se hizo por el método de Biuret (Gornall y col., 1949). Los resultados se expresaron en  $\mu$ g de SDS unidos por 500  $\mu$ g de proteína. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado expresándose los resultados como valores promedio.

### 2.3.2. Calorimetría diferencial de barrido

El grado de desnaturalización proteica se evaluó midiendo la entalpía asociada al proceso de desnaturalización por efecto térmico, basándose en la calorimetría diferencial de barrido (DSC) que es una técnica que permite estudiar procesos en los que se produce una absorción o desprendimiento de calor. Para ello, la sustancia de interés y una referencia inerte son mantenidas a la misma temperatura mientras la temperatura de ambas se aumenta gradualmente a una velocidad de calentamiento uniforme. Cualquier cambio térmico o flujo de calor que ocurra entre la muestra y la referencia es registrado como un pico en el termograma, registro que se obtiene del flujo de calor,  $\partial H/\partial t$ , en función de la temperatura o del tiempo. La integración del flujo diferencial de calor respecto de la temperatura (o del tiempo) proporciona el valor del cambio entálpico inducido por el calor asociado con el cambio de estado ocurrido en la sustancia de interés (Wright, 1982).

Los análisis se realizaron en un calorímetro Dupont modelo 910 con un

registrador Hewlett Packard 7046B. Las muestras empleadas fueron dispersiones de aislados proteicos de soja al 20% (p/v) en agua destilada y en NaCl 0,2M. Se emplearon cápsulas de aluminio en las que se colocaron 15 a 20 mg de muestra y luego se sellaron herméticamente. Como referencia se utilizó una cápsula doble de aluminio vacía. La velocidad de calentamiento usada, salvo que se indique otra cosa, fue 10°C/min, y el rango de temperatura entre 30 y 140°C. Después que se realizó la corrida de DSC, las cápsulas fueron perforadas y se determinó el contenido de materia seca calentando las mismas en estufa a 105°C hasta peso constante. Las determinaciones se hicieron por triplicado. Para cada termograma obtenido se trazó la correspondiente línea de base, construída como una línea recta que une el comienzo y la finalización de la transición térmica. El área resultante se midió en un analizador de imágenes Morphomat 34 Zeiss.

La entalpía de la transición térmica se estimó usando la siguiente ecuación:

$$\Delta H = \frac{A \cdot 60 \cdot \Delta q_s \cdot S_x}{m \cdot \beta} \quad (1)$$

donde

$\Delta H$  = entalpía de la transición (cal/g)

$A$  = área de la endoterma (cm<sup>2</sup>)

60 = 60 seg/min

$S_x$  = sensibilidad en el eje X (°C/cm)

$\beta$  = velocidad de calentamiento (°C/min)

$m$  = masa de muestra seca (mg)

$\Delta q_s = S_y \cdot E \cdot 4,18$  (mcal/seg.cm)

siendo  $S_y$  la sensibilidad en el eje Y y E el coeficiente de la celda.

### 2.3.2.1. Calibración del equipo

La calibración de la temperatura se realizó según la norma ASTM E 698-79 a través de las endotermas de fusión de Indio ( $T_f = 156,6^\circ\text{C}$ ) ( $\partial H/\partial t$  en mV/cm vs temperatura en mV).

Se preparó una cápsula de aluminio con 15 mg de Indio que se selló herméticamente. Como referencia se usó una cápsula equivalente vacía.

Las corridas de DSC se realizaron entre  $100^\circ\text{C}$  a  $200^\circ\text{C}$  a distintas velocidades de calentamiento ( $\beta$ :  $3\text{-}25^\circ\text{C}/\text{min}$ ), obteniéndose las respectivas endotermas de fusión.

De cada endoterma se calcularon los dos términos de corrección de temperatura expresada en mV:

- Retardo térmico,  $TL_o$
- Corrección por velocidad de calentamiento,  $\beta_o$

La resistencia térmica  $R_o$  se calculó según la expresión:

$$R_o = \frac{b(\text{cm}) S_x (\text{mV}/\text{cm})}{a(\text{cm}) S_y (\text{mV}/\text{cm})} \quad (2)$$

donde  $S_x$  y  $S_y$  son las sensibilidades en abscisas y ordenadas respectivamente y  $b/a$  es la inversa de la pendiente correspondiente a la porción lineal de la primera parte de la endoterma.

El término de corrección por retardo térmico para cada velocidad queda expresado entonces como:

$$TL_o (\text{mV}) = R_o \cdot h (\text{cm}) \cdot S_y (\text{mV}/\text{cm}) \quad (3)$$

siendo  $h$  la altura del pico desde la línea de base (Figura 1).

El punto de fusión del Indio ( $156,6^\circ\text{C}$ ) equivale a 6,403 mV en las termocuplas tipo K (Cromel-Alumel) del sensor de la celda DSC. Este valor

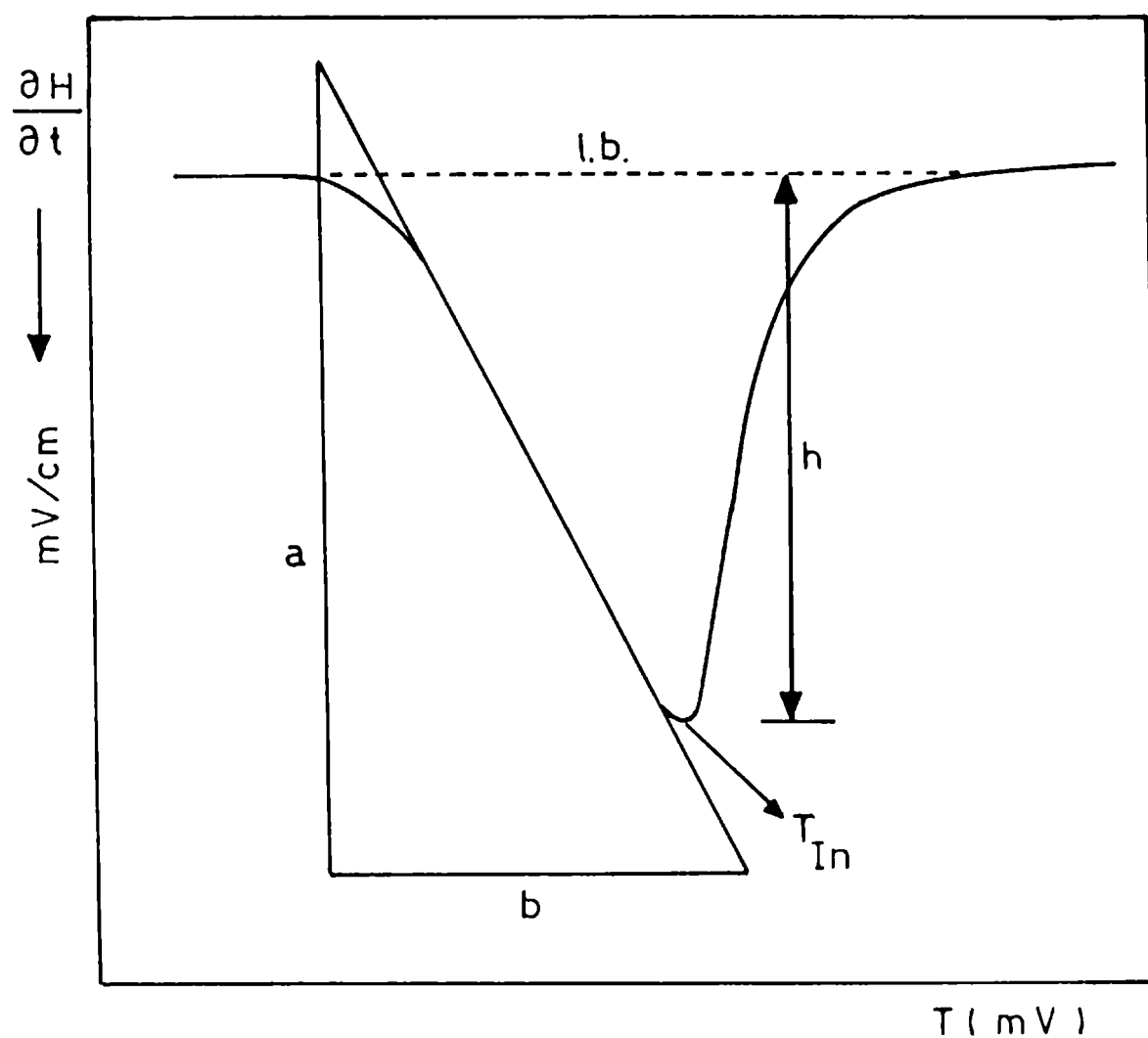


Figura 1: Termograma DSC correspondiente a la fusión del Indio para la determinación de los términos de corrección de temperatura y cálculo de la constante de celda. l.b.: línea de base; h: altura del pico;  $b/a = R_0$ : resistencia térmica;  $T_{In}$ : temperatura máxima del pico.

coincide con la temperatura del pico una vez que se realizan las correcciones por los términos  $TL_o$  y  $\beta_o$ , o sea que:

$$6,403 = T_{In} - TL_o - \beta_o \quad (4)$$

donde  $T_{In}$  es la temperatura observada en mV del pico de DSC de fusión del Indio.

De esa expresión se obtiene el valor de  $\beta_o$ .

En base a esto las temperaturas de los picos se corrigieron considerando el retardo térmico y la velocidad de calentamiento según la expresión siguiente:

$$T_{max} = T_p - R_o h S_y - \beta_o \quad (5)$$

siendo  $T_{max}$  = temperatura corregida del pico (mV)

$T_p$  = temperatura observada del pico (mV)

$S_y$  = sensibilidad en el eje y (mV/cm)

$h$  = altura del pico (cm)

$R_o$  y  $\beta_o$  = valores calculados para el Indio a cada velocidad de calentamiento.

Finalmente las  $T_{max}$  se expresaron en °C empleando la tabla de conversión de mV a °C para termocuplas tipo K (Cromel-Alumel).

El coeficiente de calibración  $E$  o coeficiente de la celda que se utiliza en el cálculo de la entalpía, se determinó a partir de las endotermas de fusión del In registradas como  $\partial H/\partial t$  vs tiempo (minutos) usando como datos la masa de sustancia colocada en la cápsula de DSC y el calor de fusión del In.

El valor de  $E$  se obtuvo a partir de la siguiente expresión:

$$E = \frac{Q_f \cdot m}{60 A \cdot B \cdot S_y} \quad (\text{mW/mV}) \quad (6)$$

donde  $Q_f$  = calor de fusión del Indio, 28,4 J/g

$m$  = masa de In (mg)

60 = 60 seg/min

$A$  = área de la endoterma ( $\text{cm}^2$ )

$B$  = base de tiempo (min/cm)

$S_y$  = escala de ordenadas (mV/cm)

Con el valor de  $E$  se calculó la sensibilidad  $\Delta q_s$  utilizada en el eje  $\partial H/\partial t$ , expresada en mcal/seg.cm, teniendo en cuenta que  $1 \text{ mW} = 1 \text{ mJ/seg}$ .

### 2.3.2.2. Cálculo de las constantes cinéticas del proceso de desnaturalización térmica de las proteínas de soja

Se calcularon la energía de activación y la constante de velocidad de la desnaturalización térmica correspondientes a las proteínas de soja. Dicho proceso se evaluó en aislados proteicos de laboratorio (proteinato de sodio dializado y sin dializar y proteinato de calcio) y también en las proteínas  $\beta$ -conglucina y glicina parcialmente purificadas.

Las determinaciones se llevaron a cabo de acuerdo a los métodos de Kissinger (1956, 1957) y de Osawa (1970).

### 2.3.3. Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Se hicieron electroforesis en placa (180 x 140 x 0,7 mm) en geles de poliacrilamida con SDS de acuerdo al sistema de buffer discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970; Laemmli y Favre, 1973). Las corridas electroforéticas se realizaron en un equipo Pharmacia GE-214.

### 2.3.3.1. Soluciones empleadas

#### a) Solución madre de acrilamida-bisacrilamida

Acrilamida 30% (p/v)

Bisacrilamida 0,8% (p/v)

#### b) Buffer del gel apilador (de "staging")

Tris 0,5M

SDS 0,4% (p/v)

TEMED 0,4% (v/v)

Se llevó a pH 6,8 con HCl 1N

#### c) Buffer del gel separador

Tris 1,M

SDS 0,4% (p/v)

TEMED 0,4% (v/v)

Se llevó a pH 8,8 con HCl 1N.

#### d) Buffer de corrida

Tris 0,05M

Glicina 0,384M

SDS 0,1% (p/v)

pH 8,3

#### e) Buffer de muestra

Con 2-mercaptoetanol (ME)

Tris 0,01M

EDTA 0,001M

SDS 1% (p/v)



ME            5% (v/v)

Glicerol    20% (v/v)

Azul de bromofenol

Se llevó a pH 8 con HCl 1N

Sin 2-mercaptoetanol

Se preparó de la misma manera sin agregar 2-mercaptoetanol.

f) Persulfato de amonio:

Se preparó una solución al 10% (p/v) en agua destilada de persulfato de amonio que se guardó a -60°C.

g) Solución fijadora y colorante

Acido acético glacial            17% (v/v)

Metanol                            42% (v/v)

Coomassie brilliant blue R-250    0,1% (p/v)

Agua destilada                    42% (v/v)

Se filtró antes de usar.

h) Solución decolorante

Acido acético glacial            10% (v/v)

Metanol                            25% (v/v)

Agua destilada                    60% (v/v)

2.3.3.2. Preparación de los geles

a) Gel separador

	Concentración de acrilamida	
	12,3%	11,5%
Buffer del gel separador (ml)	5,65	5,65
Solución madre acrilamida-bis acrilamida (ml)	9,20	8,60
A.D (ml)	7,55	8,15
Persulfato de amonio (ml)	0,1	0,1

b) Gel apilador

	Concentración de acrilamida
	4%
Buffer del gel de "stacking" (ml)	2,5
Solución madre acrilamida-bis acrilamida (ml)	1,3
A.D (ml)	6,13
Persulfato de amonio (ml)	0,07

Las cantidades dadas son las necesarias para preparar dos placas.

2.3.3.3. Preparación de las muestras

A las muestras se les agregó buffer de muestra con o sin 2-mercapto-etanol en una relación muestra:buffer de 2:1 y 3:1 según los casos. Antes de sembrarlas, las mismas se calentaron a baño María durante 2 min a 100°C.

2.3.3.4. Condiciones de corrida

Las corridas se hicieron en una cuba refrigerada con un voltaje de 60V en el gel apilador y 120V en el gel separador. El tiempo de corrida fue aproximadamente 6 h.

2.3.3.5. Estimación de los pesos moleculares

Para la determinación de los pesos moleculares de las distintas especies proteicas por electroforesis en geles de poliacrilamida, se utilizaron dos tipos de estándares: una mezcla de proteínas de alto peso molecular (MW-SDS-200 kit, Sigma Chemical Co.) y otra de bajo peso molecular (MW-SDS 70L kit, Sigma Chemical Co.). Los componentes de cada mezcla fueron los siguientes:

MW-SDS-70L kit	Peso molecular aproximado (kDa)
Albúmina bovina	66,0
Albúmina de huevo	45,0
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (subunidad)	36,0
Anhidrasa carbónica	29,0
Tripsinógeno	24,0
Factor inhibidor de tripsina	20,1
$\alpha$ -lactoalbúmina	14,2

MW-SDS-200 kit

Anhidrasa carbónica	29,0
Albúmina de huevo	45,0
Albúmina bovina	66,0
Fosforilasa b (subunidad)	97,4
$\beta$ -galactosidasa (subunidad)	116,0
Miosina	205,0

La determinación de los pesos moleculares se realizó mediante una curva de calibración obtenida al graficar los logaritmos de los pesos moleculares de las proteínas estándares en función de la distancia recorrida por la especie proteica en el gel separador, tomando como referencia el inicio del gel separador.

2.3.3.6. Densitografía de los geles

Una vez que los geles se decoloraron se realizó la densitografía de los mismos. Para ello se utilizó un espectrodensitógrafo Shimadzu TLC Scanner CS-910 de doble longitud de onda. Se seleccionó como longitud de onda para la muestra 570nm y 395nm como referencia.

Para realizar la cuantificación se determinaron las áreas de los picos usando un lector de imágenes Morphomat 34 Zeiss.

### 2.4. DETERMINACION DE PROPIEDADES FUNCIONALES EN LOS AISLADOS DE PROTEINAS DE SOJA ESTUDIADOS

#### 2.4.1. Solubilidad

Se prepararon dispersiones al 1% (p/v) de los aislados proteicos de soja en agua destilada y se agitaron magnéticamente durante 1 h a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 10.000 rpm (centrífuga Sorvall RC-5B, rotor SS34) durante 20 min a 4°C. En una alícuota del sobrenadante se determinó el contenido de proteínas solubles mediante el método de Biuret (Gornall y col., 1949).

La solubilidad proteica se expresó como porcentaje del contenido de proteína total del aislado de soja. Las determinaciones se hicieron por duplicado expresando los resultados como valores promedio.

#### 2.4.2. Capacidad de absorción de agua

La cantidad de agua absorbida por las proteínas varía de acuerdo con la técnica que se emplee para su determinación. Fleming y col. (1974) desarrollaron un método en el cual la cantidad de agua absorbida por una dispersión de proteína al 10% equivalía a la disminución del volumen que ésta experimentaba luego de su centrifugación en condiciones predeterminadas. Este procedimiento tiene varias limitaciones; una de ellas es que la fuerza que se aplica para separar las fases también actúa sobre la matriz insoluble, exprimiéndola. Este efecto será distinto en un material con partículas cuyos poros sean grandes los que dejarán escapar más líquido que otro con partículas de menor tamaño de poro (Hermansson, 1986a).

Hermansson (1972) por su parte, describió a la imbibición del agua por las partículas como un proceso espontáneo. En base a ello diseñó el aparato

de Bauman para medir el agua absorbida espontáneamente por las partículas, la que se ubica dentro de la matriz proteica.

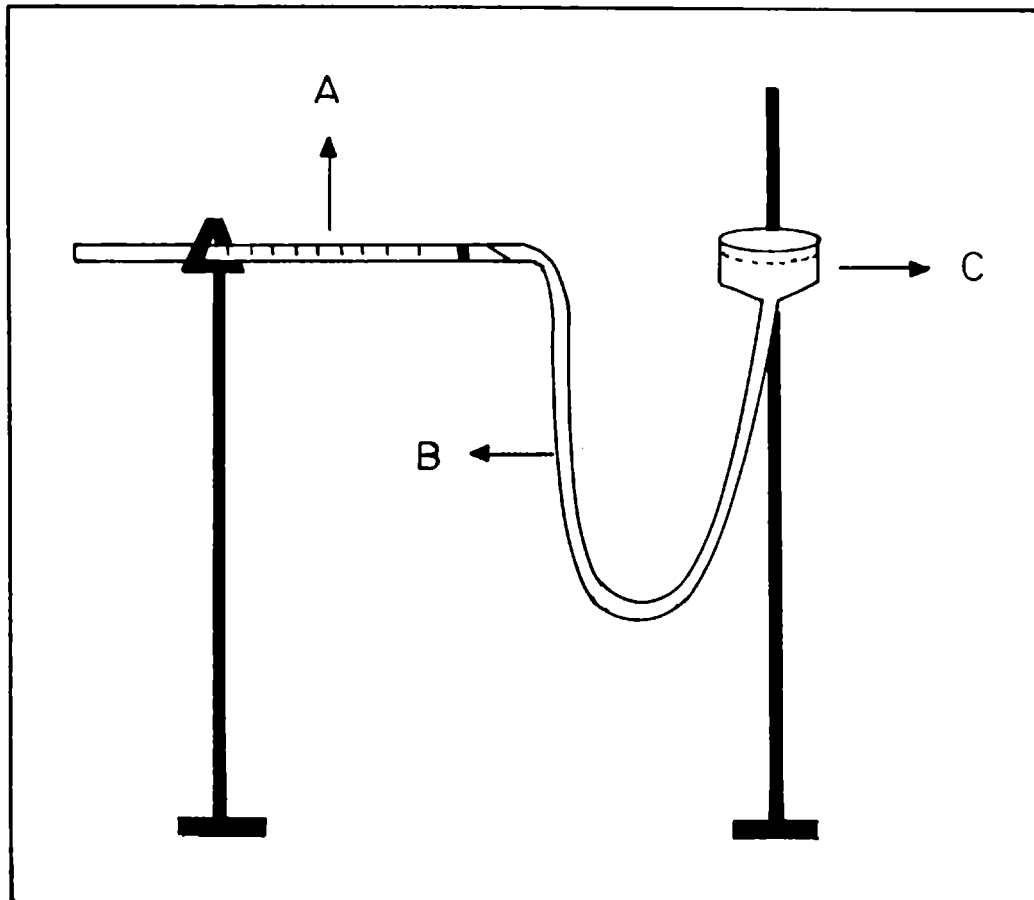
### **2.4.2.1. Equipo empleado**

Para medir la capacidad de absorción de agua de los aislados proteicos de soja se empleó el aparato de Baumann. Este consiste en un embudo Buchner conectado a un capilar graduado que se apoya horizontalmente, como se puede observar en la Figura 2. En el embudo se coloca un papel de filtro que se humedece con el líquido que llena el embudo y el capilar y posteriormente se enrasa. 50 mg de muestra se esparcen sobre el papel de filtro en forma de fina lluvia valiéndose de un tamiz. La absorción del líquido puede ser seguida en el capilar, registrándose el valor máximo al que se llega cuando la lectura se hace constante.

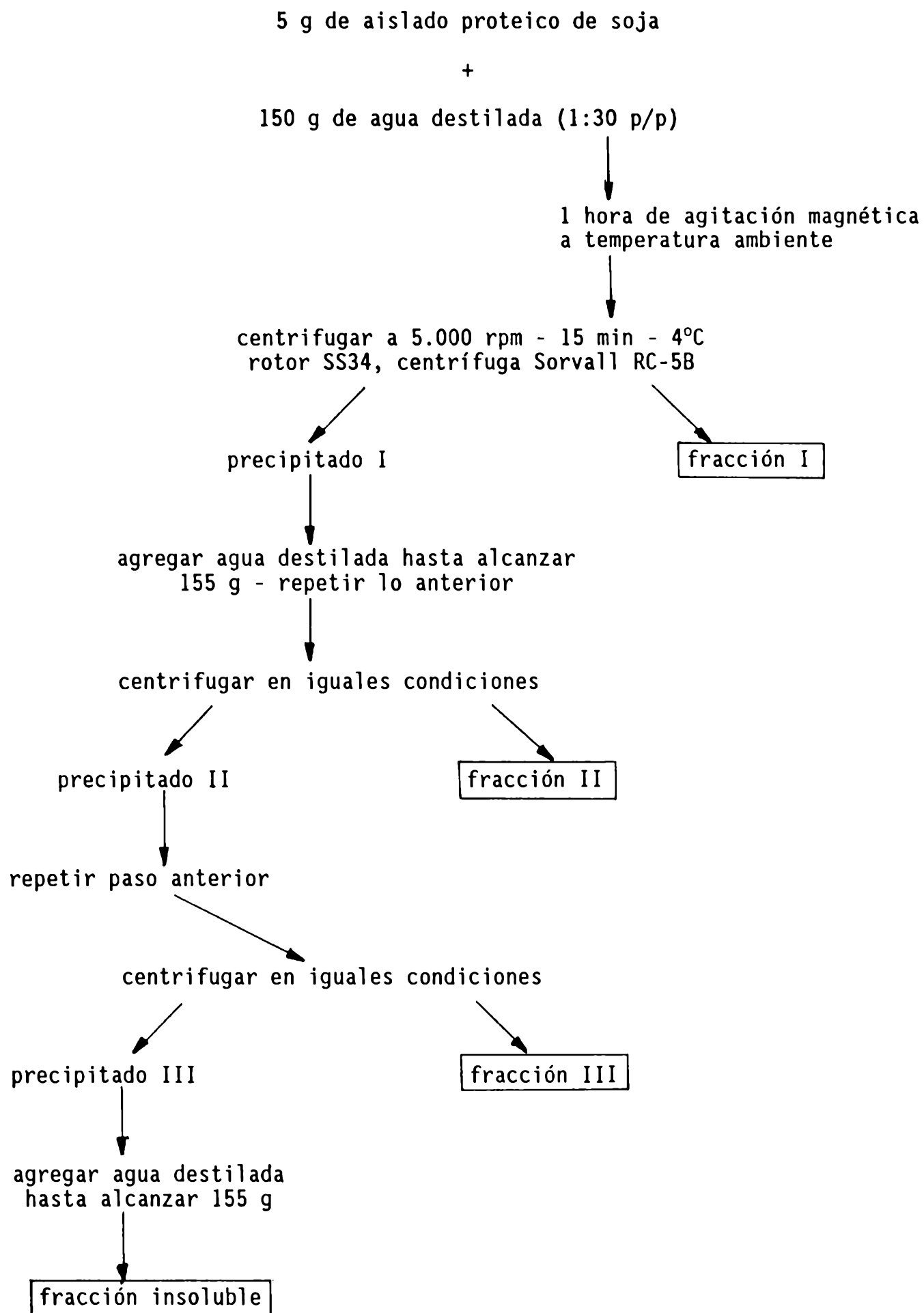
La capacidad de absorción de agua (WIC) se expresó en ml de agua/g de aislado. Cada determinación se realizó por duplicado y luego se calculó el promedio.

### **2.4.2.2. Capacidad de absorción de agua de las fracciones proteicas solubles e insolubles**

En un conjunto de diez aislados comerciales de proteínas de soja se aplicó el esquema que se muestra a continuación con el objeto de obtener muestras de extractos acuosos de tres etapas consecutivas de extracción y de la fracción remanente o insoluble. Las mismas se utilizaron para estudiar el grado de desnaturalización, la composición proteica, la WIC y el grado de agregación de las proteínas.



**Figura 2:** Equipo utilizado para la medida de la capacidad de absorción de agua. A: pipeta de un mililitro; B: tubo de plástico; C: embudo Buchner con tapa de vidrio.





Todos los extractos y fracciones insolubles fueron liofilizados.

Antes de la liofilización se tomaron alícuotas de las fracciones solubles en las que se determinó el contenido de proteínas por el método de Biuret (Gornall y col., 1949). En el caso de la fracción insoluble el contenido de proteínas se calculó por diferencia entre el contenido total de proteínas del aislado y la suma de las cantidades extraídas en cada etapa.

### 2.4.2.3. Grado de agregación de las proteínas en las fracciones solubles e insolubles

Se evaluó el estado de agregación por medida de la turbidez a 600 nm de dispersiones de proteínas de 3 mg/ml.

### 2.4.3. Viscosidad

Se determinó la viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) de dispersiones entre 2,5% y 14% p/p de aislados proteicos de soja en agua destilada. Las medidas se realizaron a 20°C en un viscosímetro Haake Rotavisco usando un sistema sensor NV con una velocidad del rotor de 0 hasta 128 rpm, según el siguiente programa: 2 minutos: barrido de la velocidad desde 0 hasta 128 rpm; 1 minuto: mantenimiento de la velocidad en 128 rpm y 2 minutos: barrido de la velocidad desde 128 rpm a 0 rpm. Las curvas de flujo  $S$  (ordenadas) en función de  $n$  (abscisas), fueron registradas con un registrador Hewlett Packard x-y-t Haake. La viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) de la dispersión analizada se calculó según la siguiente fórmula:

$$(\eta_{ap}) = G \cdot \frac{S}{n} \text{ (mPa.seg o cp)} \quad (7)$$

donde  $G$  = factor del instrumento (mPa seg/divisiones de la escala . min)

$S$  = valor observado en la escala a 128 rpm (divisiones de la escala)

$n$  = velocidad del rotor ( $\text{min}^{-1}$ )

El valor  $S$  es proporcional al esfuerzo  $\sigma$  según la expresión  $\sigma = a.S$  donde  $a$  es un factor de empuje dependiente del sistema de medición y tipo de cabezal empleado. El valor  $n$  es proporcional a la "velocidad de deformación,  $\dot{\gamma}$ " ( $\text{seg}^{-1}$ ) según  $\dot{\gamma} = m_c.n$  donde  $m_c$  es un factor de cizallamiento dependiente del sistema de medición. Como el factor  $G$  es  $10^3 \frac{a}{m_c}$  entonces surge

$$\eta_{ap} \approx \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} \quad (8)$$

que es la ecuación habitual con que se define a la viscosidad.

### 2.4.3.1. Relación de agua total a agua embebida (T/I)

Se calcularon las relaciones entre la cantidad de agua total y la del agua embebida de las dispersiones de aislados proteicos de soja a las que se les determinó la  $\eta_{ap}$  de acuerdo a Urbanski y col. (1983).

$$\frac{T}{I} \approx \frac{\text{g agua total por g de dispersión}}{\text{g agua embebida por g de dispersión}} \approx \frac{1 - P}{P.WIC} \quad (9)$$

donde  $P$  = g de aislado/g de dispersión y  $WIC$  = g de agua embebida por g de aislado.

### 2.4.4. Capacidad de gelificación

Para evaluar la capacidad de gelificación de los aislados proteicos de soja se determinó la viscosidad de dispersiones al 10% p/p en agua destilada calentados a  $80^\circ\text{C}$  durante 30 min y posteriormente enfriados durante

toda la noche en cámara a 4°C. La viscosidad de los geles se midió a 25°C en un viscosímetro Brookfield RVT usando el sistema Helipath con la serie de rotores T Spindle a 5 rpm.

Los valores se expresaron en poises y corresponden al promedio de dos determinaciones.

### 3.2.5. Capacidad de emulsificación

La capacidad de emulsificación de los aislados de proteínas de soja se determinó de acuerdo a la técnica desarrollada por Tejada y col. (1984). Para ello se empleó una licuadora Kenwood modelo A-701-A en cuyo vaso se colocaron a nivel de las cuchillas dos electrodos de cobre diametralmente opuestos en dos orificios que se practicaron para tal fin. Los electrodos se conectaron a un ohmetro. En dicho vaso se colocaron 100 ml de agua destilada y 300 mg de aislado. La mezcla se homogeneizó licuando a baja velocidad durante 45 seg. Luego, desde una bureta y a través de un orificio realizado en la tapa del vaso se comenzó a agregar aceite con una velocidad de 0,30 g/s. Se utilizó aceite de maíz Río (Molinos Río de La Plata). En este momento la velocidad de licuado se llevó al máximo. El colapso de la emulsión se detectó por un aumento brusco de la resistencia eléctrica; allí se detuvo el agregado de aceite.

La cantidad de aceite emulsificado se calculó por diferencia de peso del vaso antes y después de agregar el aceite.

La capacidad de emulsificación (EC) se expresó en g de aceite por g de aislado de soja. Las determinaciones se efectuaron por duplicado y expresándose los resultados como el promedio de ambas determinaciones.

### **2.4.6. Tratamiento estadístico**

Los resultados fueron evaluados estadísticamente por un análisis de varianza para un nivel de confianza del 99 %. Las medias calculadas se compararon por medio de un test LSD (menor diferencia significativa) a un nivel de significación del 0,05.

**RESULTADOS  
Y  
DISCUSION**

**AISLADOS PROTEICOS  
DE SOJA  
DE ORIGEN COMERCIAL**

#### **3.1. CARACTERIZACION**

##### **3.1.1. Composición química de los aislados**

##### **3.1.1.1. Determinación del contenido de proteínas, lípidos, cenizas y humedad**

Para evaluar la composición química de los aislados comerciales de proteínas de soja se determinaron sus contenidos de proteínas, cenizas, lípidos y humedad. En la Tabla I se muestran los resultados obtenidos. El análisis de los mismos no revela diferencias importantes en la composición química de los diferentes aislados. El componente mayoritario, tal como se mencionara anteriormente, son las proteínas cuyo porcentaje varió entre 81,9-91,0%. Considerando los valores promedios de los componentes analizados la composición aproximada de un aislado de soja obtenido por la industria es:

proteínas: 86,6%  $\pm$  3,03

humedad: 6,5%  $\pm$  1,23

cenizas: 3,5%  $\pm$  0,50

lípidos: 2,2%  $\pm$  0,55

Estos componentes representan en promedio el 99% del aislado total.

##### **3.1.1.2. Análisis cuantitativo de calcio, sodio, magnesio, potasio y fósforo**

A efectos de analizar la presencia de iones en los aislados se determinó el contenido de Ca en todas las muestras estudiadas y el contenido de Na, K, Mg y P en algunas de ellas. En la Tabla II se muestran los resultados obtenidos. Se puede observar que los niveles de Na, Mg, K y P son similares prácticamente en todos los aislados, con excepción del aislado 15 cuyo contenido de P es superior al resto, del aislado 16 que posee una

**3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL**

**TABLA I:** Composición química de los aislados comerciales de proteínas de soja

Aislado	Proteínas (%)	Ceniza (%)	Lípidos (%)	Humedad (%)
1	90,0	3,2	1,68	5,7
2	90,1	3,2	1,45	6,2
3	89,5	4,6	1,59	6,5
4	89,5	3,4	1,16	6,5
5	84,8	3,8	2,76	6,4
6	89,9	2,9	1,82	7,1
7	89,6	3,4	1,98	5,8
8	89,1	3,8	2,40	7,2
9	89,0	3,1	2,10	6,4
10	89,0	2,4	1,98	6,8
11	89,0	3,3	2,28	5,4
12	83,0	3,1	1,85	7,3
13	83,1	3,8	2,03	6,3
14	85,7	3,9	2,34	5,3
15	84,0	3,8	2,31	5,4
16	85,6	4,0	2,52	6,7
17	81,9	4,1	3,16	7,5
18	81,9	2,8	3,16	7,7
19	83,0	3,5	2,98	7,1
20	83,7	2,9	1,98	7,2
21	83,0	3,6	2,47	6,3
22	91,0	3,8	1,92	3,9
23	85,4	3,8	3,11	10,6

Los valores se expresaron como porcentaje de aislado.



### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

**TABLA II:** Contenido de algunos iones de los aislados comerciales de soja

Aislado	Ca	Na	Mg	K	P
1	0,62	nd	nd	nd	nd
2	0,62	nd	nd	nd	nd
3	2,40	14,33	0,26	0,91	5,72
4	0,64	nd	nd	nd	nd
5	0,22	8,65	0,31	1,78	4,95
6	0,36	10,15	0,20	0,47	4,92
7	0,71	nd	nd	nd	nd
8	0,88	nd	nd	nd	nd
9	0,50	nd	nd	nd	nd
10	0,38	nd	nd	nd	nd
11	1,10	10,03	0,18	0,98	6,24
12	0,20	9,84	0,29	1,00	4,49
13	0,19	10,44	0,24	1,50	5,87
14	1,66	9,07	0,37	1,19	5,96
15	1,13	11,32	0,35	1,16	11,43
16	10,40	0,79	0,32	0,52	7,40
17	1,50	nd	nd	nd	nd
18	1,53	7,47	0,46	0,42	5,08
19	1,18	10,26	0,30	1,01	7,85
20	1,14	nd	nd	nd	nd
21	1,30	nd	nd	nd	nd
22	0,22	13,55	0,24	0,67	7,26
23	0,51	12,66	0,43	0,78	7,54

Los valores se expresaron en mg de ion por g de aislado.

nd: no determinado

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

cantidad de Na muy baja y del aislado 5 que contiene una cantidad de K mayor que los restantes.

En cuanto al contenido de Ca se pueden identificar dos tipos de muestras caracterizadas por niveles inferiores o superiores a 1 mg de Ca/g de aislado, respectivamente. En el último grupo se destaca la muestra 16 cuyo contenido de Ca es muy elevado.

Teniendo en cuenta que el contenido de estos iones en la harina de soja desgrasada (materia prima para la obtención de aislados proteicos de soja) es de 7,1 mg/g P; 2,2 mg/g Ca; 25,2 mg/g K; 0,004 mg/g Na y 3250 mg/g Mg (Honig y Wolf, 1987), y que la mayoría de estos iones se elimina en la precipitación isoeléctrica de las proteínas, surge claramente que los niveles detectados en los aislados estudiados provienen de agregados que se pueden efectuar en una o más etapas del proceso de obtención de estos productos. Así, por ejemplo, se mencionó previamente que se utiliza NaOH para la neutralización del precipitado isoeléctrico. Esto justifica el nivel de Na detectado en los aislados proteicos analizados. Se observa asimismo, en el caso del aislado 16, una disminución del contenido de Na asociada con un fuerte incremento del nivel de Ca lo que indicaría un reemplazo parcial en la etapa de neutralización de NaOH por  $\text{Ca(OH)}_2$ , aunque no puede descartarse el agregado de Ca en algún otro punto del proceso de obtención del aislado. Consecuentemente esta muestra sería un proteinato de calcio en lugar de un proteinato de sodio como los restantes.

Cabe asimismo señalar que la mayor proporción de P detectada proviene del fitato remanente en los aislados.

#### **3.1.1.3. Análisis cuali y cuantitativo de lípidos**

Además de la determinación del contenido de lípidos totales se realizó un análisis cuali y cuantitativo de las fracciones de lípidos neutros y polares, respectivamente.

En la Tabla I se puede observar que el contenido de lípidos totales de los aislados comerciales de proteína de soja analizados varió entre 1,16-3,16%. La mayoría de las muestras contiene 1,5-2,5% de lípidos, correspondiendo los valores máximos a los aislados 5, 17, 18, 19 y 23.

Analizando la distribución de los porcentajes de lípidos neutros (LN) y polares (LP), que se muestran en la Figura 3, se encontraron tres tipos de fórmulas las que aparentemente se relacionarían con el origen comercial de los aislados estudiados. Las muestras 17, 18, 19, 20 y 21 tienen el mismo origen y presentan una relación LP-LN de 70%-30%, con excepción del aislado 19 el cual posee 80% de LP y 20% de LN. La muestra 23 es de otra procedencia y muestra una relación LP-LN de 60%-40%. Finalmente, de las 17 muestras restantes que comparten un origen común, diferente a los antes mencionados, 14 de ellas contienen 80% de LP y 20% de LN.

Los análisis realizados permitieron identificar la presencia de lisofosfolípidos (LPL), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y otros componentes desconocidos ( $X_1$ ,  $X_2$  y  $X_3$ ) en la fracción de lípidos polares y monoglicéridos (MG), diglicéridos (DG), ácidos grasos libres (AGL) y triglicéridos (TG) en la correspondiente a lípidos neutros. En la muestra 23 además se detectó una mancha que migró con el frente del solvente, zona que corresponde a hidrocarburos, ceras o ésteres de colesterol. Considerando la naturaleza del producto analizado, es probable que la mancha observada corresponda a una cera.

Los valores de cada componente lipídico presente en los distintos aislados proteicos estudiados se muestran en la Tabla III.

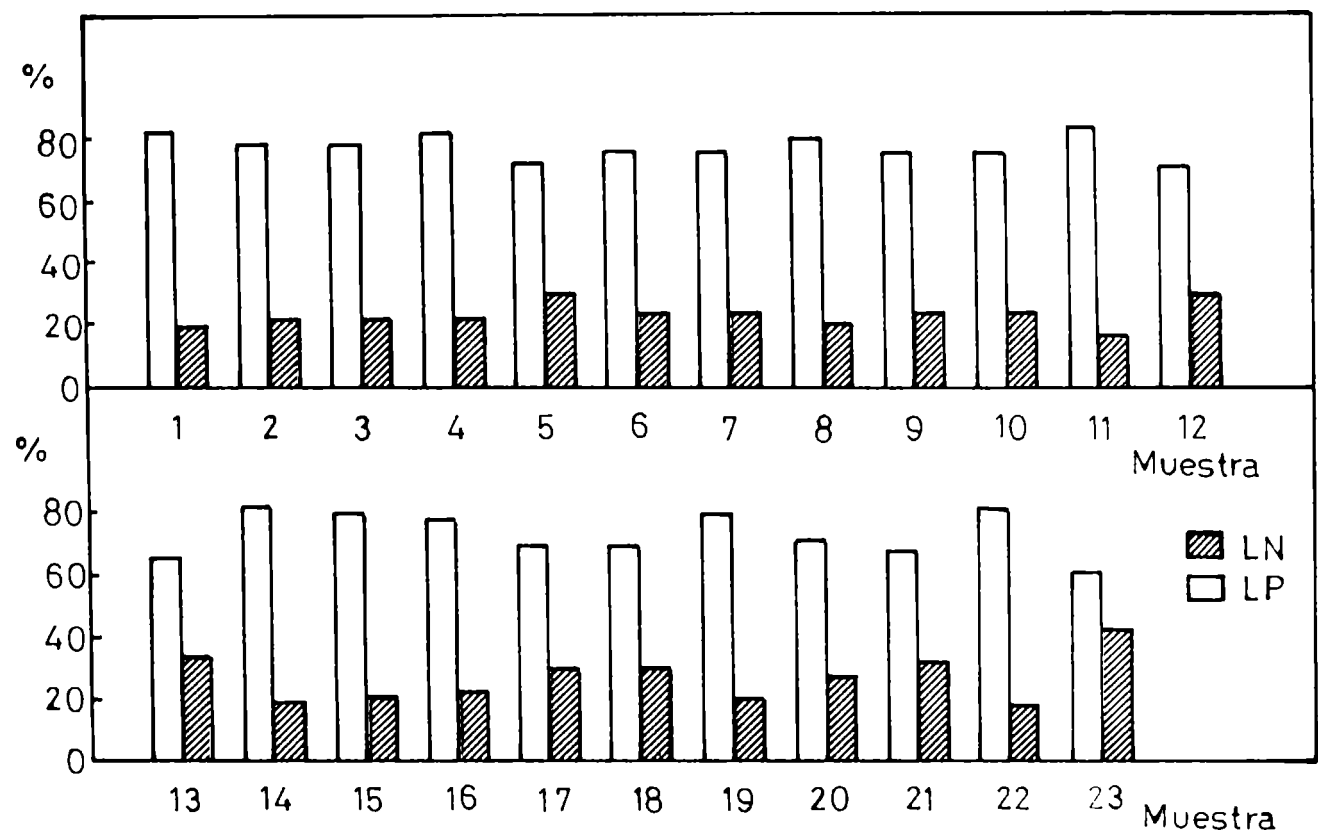


Figura 3: Porcentajes de lípidos neutros (LN) y lípidos polares (LP) referidos al contenido total de lípidos (100%) de los aislados comerciales de proteínas de soja.

3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

Tabla III: Contenido de lípidos polares y lípidos neutros de los aislados comerciales de proteínas de soja

Aislado	Lípidos polares						Lípidos neutros			
	LPL	PC	PE	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	MG	DG	AGL	TG
1	0,583	0,097	0,240	0,126	0,136	0,196	0,082	0,055	0,060	0,103
2	0,296	0,260	0,196	0,133	0,125	0,116	0,101	0,074	0,090	0,064
3	0,418	0,315	0,208	0,057	0,113	0,121	0,059	0,092	0,089	0,118
4	0,344	0,196	0,141	0,030	0,135	0,097	0,070	0,039	0,055	0,051
5	0,571	0,516	0,359	0,140	0,160	0,242	0,143	0,108	0,121	0,397
6	0,453	0,282	0,216	0,082	0,132	0,226	0,102	0,069	0,125	0,131
7	0,522	0,269	0,184	0,097	0,158	0,271	0,105	0,073	0,083	0,218
8	0,766	0,331	0,310	0,070	0,175	0,280	0,118	0,065	0,108	0,175
9	0,575	0,333	0,222	0,057	0,170	0,248	0,128	0,082	0,168	0,113
10	0,460	0,440	0,146	0,081	0,172	0,220	0,121	0,071	0,105	0,164
11	0,679	0,503	0,132	0,116	0,144	0,344	0,052	0,070	0,050	0,192
12	0,420	0,346	0,233	0,072	0,096	0,153	0,010	0,094	0,095	0,235
13	0,450	0,341	0,127	0,126	0,116	0,170	0,146	0,085	0,103	0,359
14	0,714	0,500	0,267	0,100	0,112	0,222	0,108	0,063	0,108	0,145
15	0,404	0,884	0,171	0,095	0,125	0,194	0,148	0,065	0,066	0,159
16	0,386	0,438	0,348	0,144	0,187	0,476	0,118	0,096	0,086	0,244
17	0,651	0,632	0,180	0,095	0,294	0,354	0,085	0,111	0,114	0,645
18	0,651	0,632	0,180	0,095	0,294	0,354	0,085	0,111	0,114	0,645
19	0,712	0,625	0,333	0,104	0,215	0,378	0,098	0,086	0,185	0,244
20	0,461	0,455	0,137	0,067	0,129	0,184	0,063	0,063	0,123	0,297
21	0,459	0,645	0,138	trazas	0,131	0,314	0,082	0,114	0,131	0,462
22	0,422	0,322	0,340	0,146	0,127	0,198	0,031	0,067	0,058	0,210
23*	0,560	0,631	0,106	trazas	0,208	0,280	0,110	0,162	0,171	0,211

LPL: lisofosfolípidos; PC: fosfatidilcolina; PE: fosfatidiletanolamina; X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>: desconocidos; MG: monoglicéridos; DG: diglicéridos; AGL: ácidos grasos libres; TG: triglicéridos.

Los valores se expresaron como porcentaje de aislado (% p/p).

\* En la muestra 23 en la fracción de lípidos neutros apareció una mancha que migró con el frente de solvente correspondiendo a la zona de hidrocarburos, ceras o ésteres de colesterol equivalente al 0,67%.

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

En la última etapa del proceso de obtención, a nivel industrial, de los aislados proteicos de soja se adicionan compuestos químicos, tales como fosfolípidos, para aumentar la dispersibilidad de las proteínas. Estos compuestos cubren las partículas de proteínas con una capa de igual carga eléctrica que favorece la repulsión interpartícula, facilitando así la dispersión. La sustancia más comúnmente empleada, en estos casos, es la "lecitina de soja" constituida por una mezcla de fosfolípidos.

El hecho que la harina de soja utilizada en la preparación de los aislados proteicos es previamente desgrasada mediante tratamientos con hexano, hace que se considere que los lípidos detectados en las muestras estudiadas procedan principalmente de la etapa de "lecitinización". Los resultados discutidos previamente sugieren que, de acuerdo a su origen, los aislados han sido tratados con distintas mezclas de lípidos polares y neutros.

#### 3.1.2. Grado de desnaturalización proteica

El proceso de obtención de aislados proteicos de soja involucra el agregado de ácido y álcali así como tratamientos térmicos los cuales pueden provocar la desnaturalización de las proteínas.

Se denomina desnaturalización a cambios en la estructura secundaria, terciaria o cuaternaria de las cadenas polipeptídicas. En las proteínas que se emplean para la elaboración de alimentos estos cambios afectan sus propiedades funcionales y consecuentemente su aplicabilidad (Kauzman, 1959). Es por ello que se decidió evaluar, mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC), el grado de desnaturalización de las proteínas de los aislados comerciales de soja.

La desnaturalización inducida por calentamiento es un proceso endotérmico que implica el pasaje de la conformación nativa u ordenada de una

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

proteína a otra más desplegada. Este proceso es fácilmente analizable por calorimetría diferencial de barrido. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que durante la corrida calorimétrica también puede producirse la agregación de proteínas. Si esto ocurriera la entalpía de desnaturalización podría subestimarse puesto que la agregación procede con liberación de calor (Privalov y Khechinashvili, 1974). Es posible evitar tal efecto reduciendo la concentración de la solución de proteína y usando un valor de pH de la solución lejano al punto isoeléctrico (Privalov y Khechinashvili, 1974).

En la Figura 4 se pueden observar tres termogramas correspondientes a aislados con marcadas diferencias en su grado de desnaturalización. El primer termograma es característico de muestras que contienen proteínas nativas. En él se distinguen dos transiciones endotérmicas. La primera, cuya temperatura máxima ( $T_m$ ) es  $74^{\circ}\text{C}$ , corresponde a la proteína 7S y la segunda ( $T_m$   $83^{\circ}\text{C}$ ) a la proteína 11S (Hermansson, 1978). Cabe señalar que los valores de las  $T_m$  de las distintas transiciones varían con las condiciones empleadas en la preparación de la muestra (pH, fuerza iónica, tipo de iones) y con la velocidad de calentamiento aplicada durante la corrida.

En la misma figura se pueden observar los termogramas correspondientes a los aislados 6 y 18, cuyas proteínas se encuentran parcial y totalmente desnaturalizadas, respectivamente.

Los valores de la entalpía de desnaturalización ( $\Delta H$ ) de cada aislado fueron calculados a partir del área total de la endoterma, presentándose los valores obtenidos en la Tabla IV.

Arntfield y Murray (1981), analizando por DSC proteínas de soja de origen comercial, obtuvieron un valor de entalpía de desnaturalización del aislado de 3,5 cal/g. Las entalpías de desnaturalización de las proteínas 7S y 11S, purificadas en nuestro laboratorio, fueron de 3,3 y 4,7 cal/g respectivamente, valores que coinciden con los publicados por Damodaran

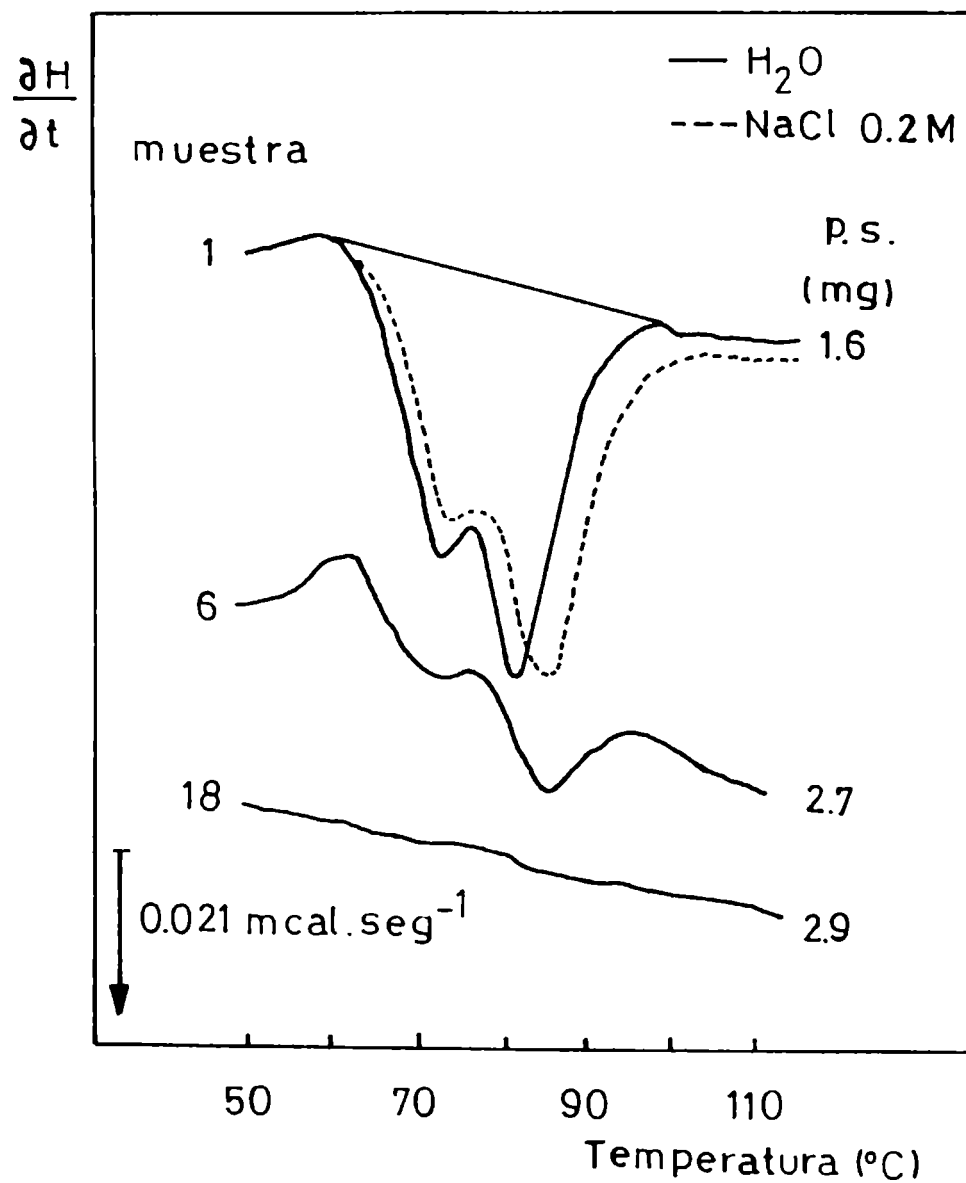


Figura 4: Termogramas DSC de aislados proteicos de soja al 20% (p/v) en agua destilada y en NaCl 0,2M. Velocidad de calentamiento:  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ . Sensibilidad:  $0,021 \text{ mcal seg}^{-1}$ . p.s.: peso seco.



**3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL**

**TABLA IV:** Entalpía de desnaturalización ( $\Delta H$ ) de los aislados comerciales de proteínas de soja

Aislado	$\Delta H$ (cal/g)	Aislado	$\Delta H$ (cal/g)
1	2,85	13	0,10
2	2,53	14	0
3	1,65	15	0
4	2,30	16	2,63
5	2,16	17	0
6	0,60	18	0
7	0,65	19	0
8	0,45	20	0
9	0,30	21	0
10	0,085	22	0
11	0,081	23	0
12	0,30		

Los valores se expresaron en cal/g de peso seco.

LSD<sub>0,05</sub>: 0,03.

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

(1988). Considerando la cantidad con que contribuyen las proteínas 7S y 11S a la composición proteica del aislado y sus entalpías de desnaturalización se obtiene un valor de  $\Delta H$  para el aislado de 3,4 cal/g. En base a esto se puede decir que de los aislados proteicos estudiados los que muestran los valores máximos de  $\Delta H$  tienen una alta proporción de proteínas nativas.

La Figura 4 también muestra el efecto del NaCl sobre la desnaturalización proteica. En la misma se puede observar que la presencia de esta sal (conc. 0,2M) produce un desplazamiento de la temperatura máxima de ambas endotermas hacia valores superiores (aproximadamente 4°C). Este hecho está indicando que el NaCl incrementa la estabilidad térmica de las proteínas.

Privalov y Khechinashvili (1974) estudiaron mediante DSC el comportamiento de varias proteínas globulares a distintos pH. Sus resultados mostraron que al aumentar la  $T_m$  de la/s transición/es endotérmica/s también se incrementa la intensidad del calor absorbido o sea el  $\Delta H$ . Asimismo demostró que el aumento de  $\Delta H$  variaba linealmente con la temperatura. Hermansson (1978), empleando la misma técnica, analizó el comportamiento de aislados proteicos de soja, preparados en el laboratorio, en presencia de agua y NaCl. Los resultados por ella obtenidos indican que el aumento de la concentración de NaCl de 0 a 1M provoca un incremento de la  $T_m$  de la/s transición/es endotérmica/s. El máximo valor de entalpía de desnaturalización se detectó a una concentración de sal igual a 0,1M. Damodaran (1988) obtuvo resultados coincidentes con los de Hermansson. En los ensayos que nosotros hemos llevado a cabo no se registra ninguna variación en la entalpía de desnaturalización correspondiente a los distintos aislados comerciales estudiados en presencia de NaCl 0,2M. Este comportamiento podría ser atribuible a la existencia de agregación ya sea de la proteína nativa o desnaturalizada. Basamos esta posibilidad en el hecho que la solubilidad de los aislados proteicos en NaCl es menor que en agua, es decir que la presencia de esta sal ejerce un efecto "salting-out" que favorece la agregación.

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

El efecto "salting-out" se lo vincula a un aumento de las interacciones hidrofóbicas entre las proteínas mediado por cambios en la estructura del agua producido por los iones (Arakawa y Timasheff, 1985). Dado que las interacciones hidrofóbicas entre los residuos no polares es la principal fuerza de estabilización de la conformación nativa de las proteínas (Kauzman, 1959; Nosaki y Tanford, 1971), se considera que los iones que ocasionan "salting-out" aumentando las interacciones hidrofóbicas entre proteínas, proporcionarían una mayor estabilidad a las mismas (Damodaram y Kinsella, 1982b). Por lo tanto, el corrimiento de las  $T_m$  en presencia de NaCl 0,2M sería atribuible al incremento de la estabilidad térmica.

#### 3.1.3. Composición proteica

##### 3.1.3.1. Composición relativa de las diferentes especies proteicas presentes en los aislados

La proporción de las proteínas 7S y 11S, presentes en los aislados proteicos de soja comerciales, se evaluó por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes (SDS-PAGE) en presencia de 2-mercaptoetanol. Las muestras fueron además, disueltas en un medio que contiene urea 8M en el cual los aislados se solubilizaron totalmente.

En estas condiciones se encontró que los perfiles electroforéticos de todos los aislados fueron similares entre sí. Como ejemplo se muestra en la Figura 5 el densitograma correspondiente a la muestra 1. Los pesos moleculares estimados de las subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  y  $\beta$  de la proteína 7S y de los polipéptidos A y B de la proteína 11S fueron: 79,8; 64,5; 46,8; 36,3 y 19,1 KDa respectivamente. Estos valores son concordantes con los valores de bibliografía (Nielsen, 1985; Brooks y Morr, 1985).

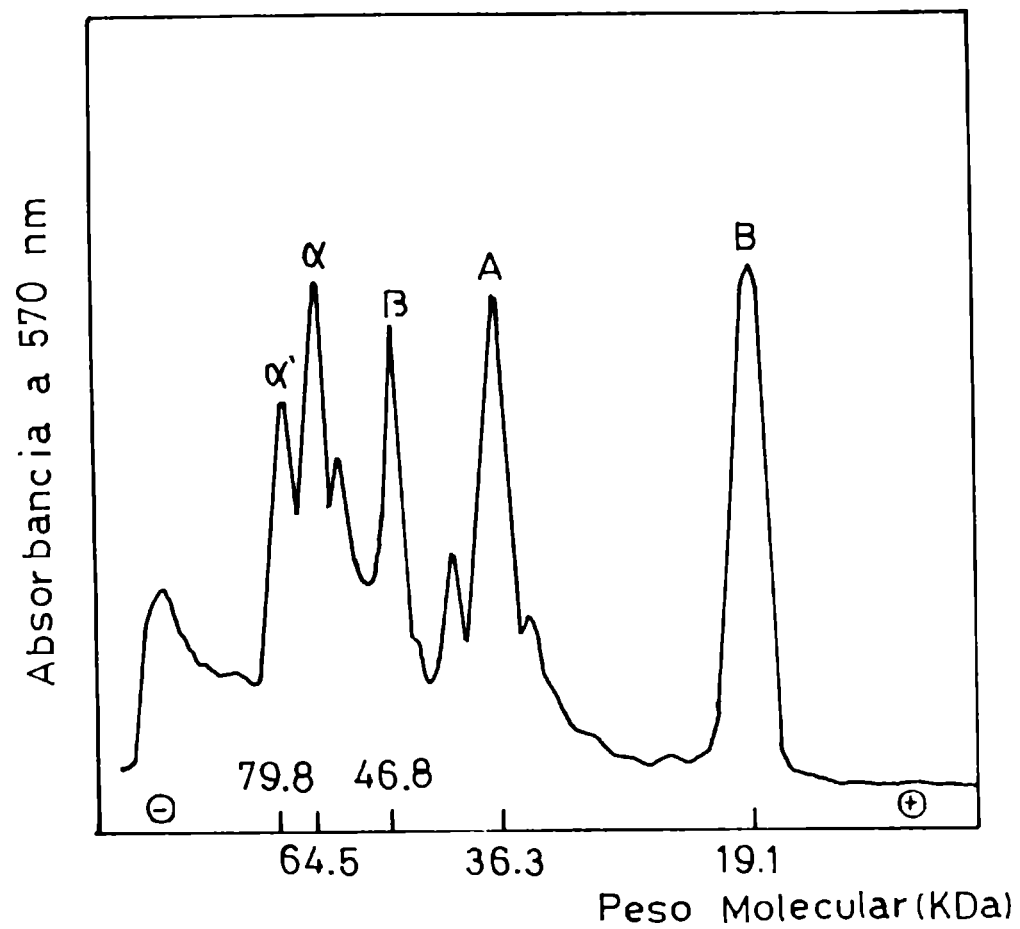


Figura 5: Densitograma de SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol correspondiente al aislado 1 solubilizado en buffer urea.  $\alpha'$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ : subunidades de la proteína 7S. A y B: polipéptidos de la proteína 11S.

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

Las estimaciones cuantitativas promedio de cada subunidad/polipéptido que se expresaron como el porcentaje que representa el área de cada pico del densitograma respecto del área total del mismo, fueron las siguientes:  $\alpha'$ :  $9,7 \pm 1,6\%$ ;  $\alpha$ :  $14,8 \pm 1,8\%$ ;  $\beta$ :  $11,1 \pm 1,44\%$ ; A:  $20,2 \pm 2,3\%$  y B:  $25,4 \pm 4,7\%$ .

El porcentaje de cada proteína, calculado como la suma de los porcentajes de las subunidades polipeptídicas respectivas fue similar en todas las muestras. Los valores promedios correspondientes fueron:  $36,8 \pm 2,3\%$  para la proteína 7S y  $43,3 \pm 2,3\%$  para la proteína 11S. En base a estos resultados se calcula que ambas proteínas constituyen aproximadamente el 85% de las proteínas de los aislados comerciales.

#### 3.1.3.2. Composición relativa de las diferentes especies proteicas de las fracciones solubles en agua

Previamente se demostró que los aislados comerciales de proteína de soja, solubilizados en urea 8M, poseen una composición proteica similar; sin embargo, cuando se realizó la SDS-PAGE de las fracciones de proteínas solubilizadas en agua destilada se observaron diferencias en los perfiles electroforéticos. En base a esas diferencias las muestras se clasificaron en cinco grupos (de I a V). Los perfiles característicos correspondientes a cada grupo se muestran en la Figura 6a-e. La distribución de las muestras en los grupos y la estimación cuantitativa de cada subunidad y polipéptido para todos los aislados analizados se presenta en la Tabla V.

En los grupos I a IV la proporción de la subunidad  $\beta$  de la proteína 7S en la fracción soluble en agua disminuye a medida que el grado de desnaturalización de los diferentes aislados aumenta. Similarmente, en los aislados completamente desnaturalizados la proporción del polipéptido B de la proteína 11S también disminuye. En base a estos resultados se puede sugerir

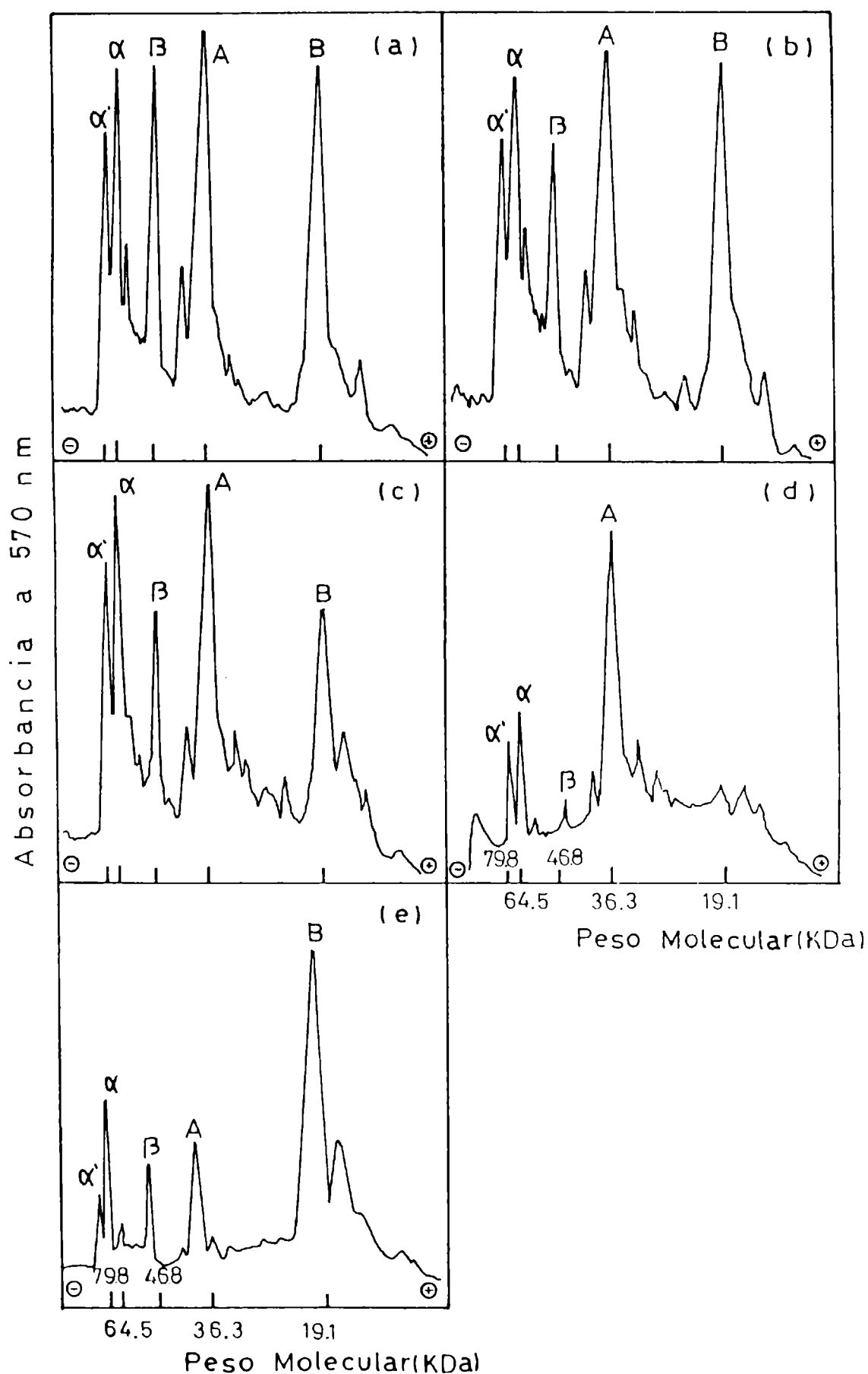


Figura 6: Densitogramas de SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol de las fracciones proteicas solubles en agua correspondientes a diferentes aislados proteicos de soja. a: muestra 5; b: muestra 12; c: muestra 15; d: muestra 19; e: muestra 16.

3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

TABLA V: Estimación cuantitativa de las subunidades y polipéptidos de las proteínas 7S y 11S de las fracciones solubles en agua analizadas por SDS-PAGE

Grupo	Aislado	7S			11S	
		% $\alpha'$	% $\alpha$	% $\beta$	% A	% B
I $\Delta H > 2$	1,2,3, 4,5	5,4-7,9	7,2-11,4	12,1-16,5	24,1-28,2	18,7-28,1
II $0 < \Delta H < 1$	6, 7, 8, 9, 10,12,13	5,0-9,9	7,0-14,3	6,4-8,8	16,0-31,3	19,9-24,1
III $\Delta H \approx 0$	11,14,15 17,18,20 21,22,23	3,6-11,1	6,0-17,4	3,8-9,9	18,7-46,2	9,3-18,9
IV $\Delta H = 0$	19	5,6	8,7	2,2	48,5	4,5
V $\Delta H = 2,16$	16	2,2	5,0	3,4	8,5	39,4

$\Delta H$  = cal/g

Los porcentajes de cada subunidad/polipéptido se expresaron como el porcentaje que representa el área de cada pico del densitograma respecto del área total del mismo.

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

que las subunidades  $\beta$ -7S y los polipéptidos B-11S de los aislados completamente desnaturalizados se encuentran formando agregados que son insolubles en agua. Por otra parte, los aislados con alta proporción de proteína nativa (grupo I) muestran un contenido bajo de tales agregados.

Utsumi y col. (1984) demostraron que el polipéptido B de la proteína 11S tiene alta afinidad por la subunidad  $\beta$  de la proteína 7S y que interactúan formando macrocomplejos.

En los aislados de los grupos III y IV donde se observó que mayoritariamente las subunidades  $\beta$  y los polipéptidos B se encuentran en la fracción insoluble en agua, es probable que durante el proceso de obtención de los mismos se hayan aplicado condiciones que han producido la disociación de las proteínas 7S y 11S. Por lo tanto, los agregados  $\beta$ -B se formarían como consecuencia de las condiciones de proceso y de la afinidad descrita entre las subunidades  $\beta$ -7S y los polipéptidos B-11S.

El proteinato de calcio (aislado 16), integrante del grupo V, presenta una composición de proteínas solubles en agua totalmente distinta a la de otros aislados y en particular a aquellos del grupo I a pesar que el grado de desnaturalización proteica es similar. Cabe señalar que el proteinato de calcio es el aislado con menor solubilidad en agua lo que indica un mayor grado de agregación proteica. Los resultados obtenidos muestran que el tipo de agregación que presenta el aislado 16, muy probablemente mediado por los iones calcio, es diferente al que presentan los aislados de los grupos III y IV desnaturalizados por acción del calor.



### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

#### **3.1.3.3. Comparación entre las especies proteicas solubles en agua y en NaCl 0,2M**

La evaluación del comportamiento de las proteínas estudiadas frente al NaCl 0,2M fue de nuestro interés dado que esta sal es un ingrediente de uso común en la elaboración de alimentos.

En la Figura 7 se comparan los resultados de las electroforesis correspondientes a las fracciones proteicas solubles en agua destilada y en NaCl 0,2M de los grupos descritos en el punto anterior. En el caso del grupo I (aislados con proteínas nativas) se observó que la composición de las especies proteicas solubles en agua y ClNa 0,2M fue similar aunque la solubilidad de las muestras es menor en presencia de sal. Los aislados de los grupos II, III y IV, cuyas proteínas se encuentran parcial o totalmente desnaturalizadas, presentaron un comportamiento algo diferente en ClNa 0,2M. En este caso se observó una menor solubilización que en agua de la subunidad  $\beta$ -7S y una proporción mayor de polipéptido B-11S soluble. Este comportamiento es más evidente en los aislados con proteínas más desnaturalizadas (grupos III y IV).

Se observaron además otras diferencias menores las que no se incluyen en este análisis por ser cercanas al error de las determinaciones efectuadas.

A pesar que la solubilidad de todos los aislados estudiados fue menor en NaCl que en agua, solamente se encontraron diferencias en la composición de las especies proteicas solubles, en ambos medios, en el caso de los aislados con mayor grado de desnaturalización. Estas diferencias residen, tal como se vio anteriormente, en la proporción en que se solubilizan en agua o NaCl los componentes  $\beta$ -7S y B-11S. Este hecho sugiere que los agregados  $\beta$ -B insolubles en agua estarían fundamentalmente estabilizados por interacciones no-covalentes dado que se logra modificar su solubilidad por efecto

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

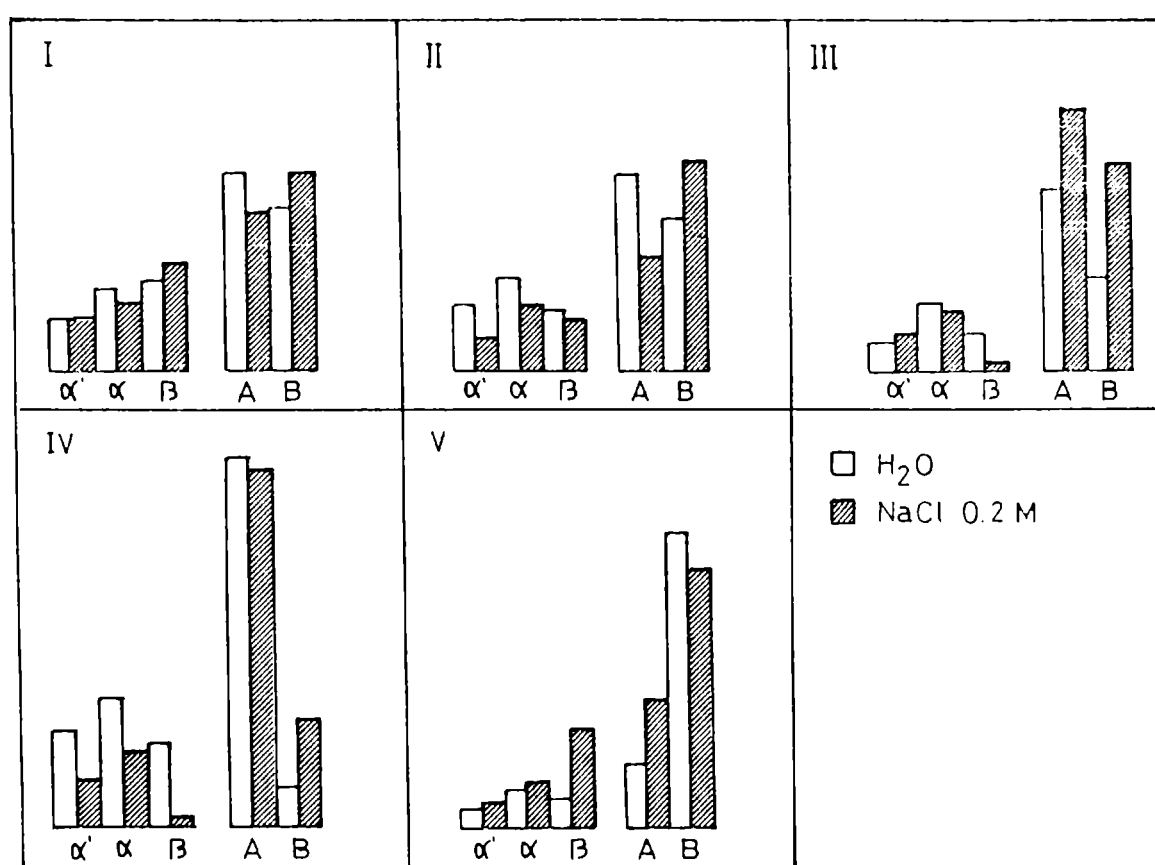


Figura 7: Comparación de las SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol de las fracciones solubles en agua destilada y en NaCl 0,2M correspondientes a distintos aislados proteicos de soja. I: muestra 5; II: muestra 12; III: muestra 15; IV: muestra 19; V: muestra 16.

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

salino. Los resultados obtenidos mediante electroforesis sugieren asimismo que la subunidad  $\beta$ -7S tendría una mayor sensibilidad para agregarse que el polipéptido B-11S. Este comportamiento podría explicarse en base a la composición aminoacídica de ambas especies proteicas; la subunidad  $\beta$ -7S podría ser más rica en aminoácidos con residuos hidrofóbicos que el polipéptido B-11S. También podría ser que el grado de desplegamiento alcanzado por ambas cadenas polipeptídicas, como consecuencia del proceso, no sea equivalente. En este caso la diferencia de comportamiento se debería al hecho que la subunidad  $\beta$ -7S tendría un mayor número de residuos hidrofóbicos expuestos que el polipéptido B-11S.

Además, se considera que las proteínas nativas se comportan de manera diferente a las desnaturalizadas en presencia de NaCl 0,2M, porque la sal actuaría modificando las interacciones hidrofóbicas las cuales son más importantes en las proteínas desnaturalizadas.

Finalmente se observó que los distintos componentes proteicos del aislado 16 (grupo V) se solubilizaron en mayor proporción en NaCl 0,2M que en agua, lo que concuerda con la mayor solubilidad de este aislado en la solución salina. Este aumento de la solubilidad no depende de una especie en particular sino de todas en general. Quizás esta diferencia esté relacionada con el alto contenido de Ca que posee la muestra.

#### 3.1.4. Contenido de grupos sulfhidrilos libres y totales

##### 3.1.4.1. Resultados de la determinación

El contenido de grupos sulfhidrilos (SH) totales y libres de los aislados comerciales de proteína de soja estudiados se muestran en la Tabla VI.

3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

TABLA VI: Contenido de grupos sulfhidrilos (SH) libres y totales de los aislados comerciales de proteínas de soja

Grupo	Aislado	SH libre	SH total
A	1	0,20	38,5
	2	0,32	45,2
	3	0,17	40,1
	4	0,09	45,5
	5	0,18	49,9
	6	0,04	44,5
	7	0,18	41,0
	8	0,25	41,8
	9	0,49	39,6
	10	0,75	43,0
	12	0,03	44,5
	13	0,32	42,6
	16	0,81	42,8
B	11	2,32	47,7
	14	3,39	48,5
	15	1,13	42,4
	17	2,06	47,5
	18	4,76	48,0
	19	4,71	45,8
	20	2,43	46,2
	21	2,65	47,8
	22	3,74	47,8
	23	1,18	50,1

Los valores se expresan en  $\mu\text{mol}$  de SH/g de proteína total del aislado.  
 $\text{LSD}_{0,05}$ : 0,06.

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

El contenido de SH totales surge de la suma de los SH libres y los SH que provienen de la reducción de las uniones disulfuro. Se puede observar que la mayoría de las muestras tienen un contenido similar de SH totales el cual varía entre 38,5 - 50,1  $\mu\text{mol}$  SH/g proteína, siendo el valor medio  $44,8 \pm 3,3$   $\mu\text{mol}$  SH/g proteína.

Las proteínas 7S y 11S constituyen los componentes proteicos mayoritarios de los aislados de soja (Wolf, 1970); en el caso de los aislados comerciales empleados se determinó electroforéticamente que ambas fracciones componen el 85% del total de las proteínas. Para realizar una estimación aproximada del contenido de SH totales y libres de las muestras se consideró que todos los grupos SH derivan de la proteína 11S, dado que la proteína 7S no contiene cisteína (Thanh y Shibasaki, 1977) o contiene sólo dos grupos (Koshiyama, 1968). Teniendo en cuenta que la proteína 11S posee entre 18 y 20 uniones disulfuro por molécula (Saio y col., 1971; Kella y Kinsella, 1985) y entre 1,6 y 5,6 grupos SH libres (Draper y Catsimpoilas, 1978; Nakamura y col., 1984; Simard y Boulet, 1978) y considerando que el peso molecular de la proteína 11S es de 356 kDa (Nielsen, 1985), resulta que el contenido de SH totales estimado para la proteína 11S varía entre 106-128  $\mu\text{mol/g}$  de proteína 11S.

Si ahora se considera que el contenido promedio aproximado de la proteína 11S en los aislados analizados es del 43% y el contenido de proteínas promedio de los mismos del 86,6%, se puede estimar el contenido de SH totales por g de proteína total de aislado. Dicho valor varió entre 39,5 y 47,7  $\mu\text{mol}$  SH totales/g proteína del aislado. Puede observarse que el contenido de SH totales obtenidos experimentalmente concuerda con los valores estimados.

Si se analizan los valores determinados de SH libres se pueden diferenciar dos grupos de muestras, A y B. Los aislados del grupo A presentaron

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

un contenido de SH libres bajo (menor que 1  $\mu\text{mol/g}$ ) mientras que en los aislados del grupo B dicho contenido varió entre 1,13 y 4,76  $\mu\text{mol/g}$ .

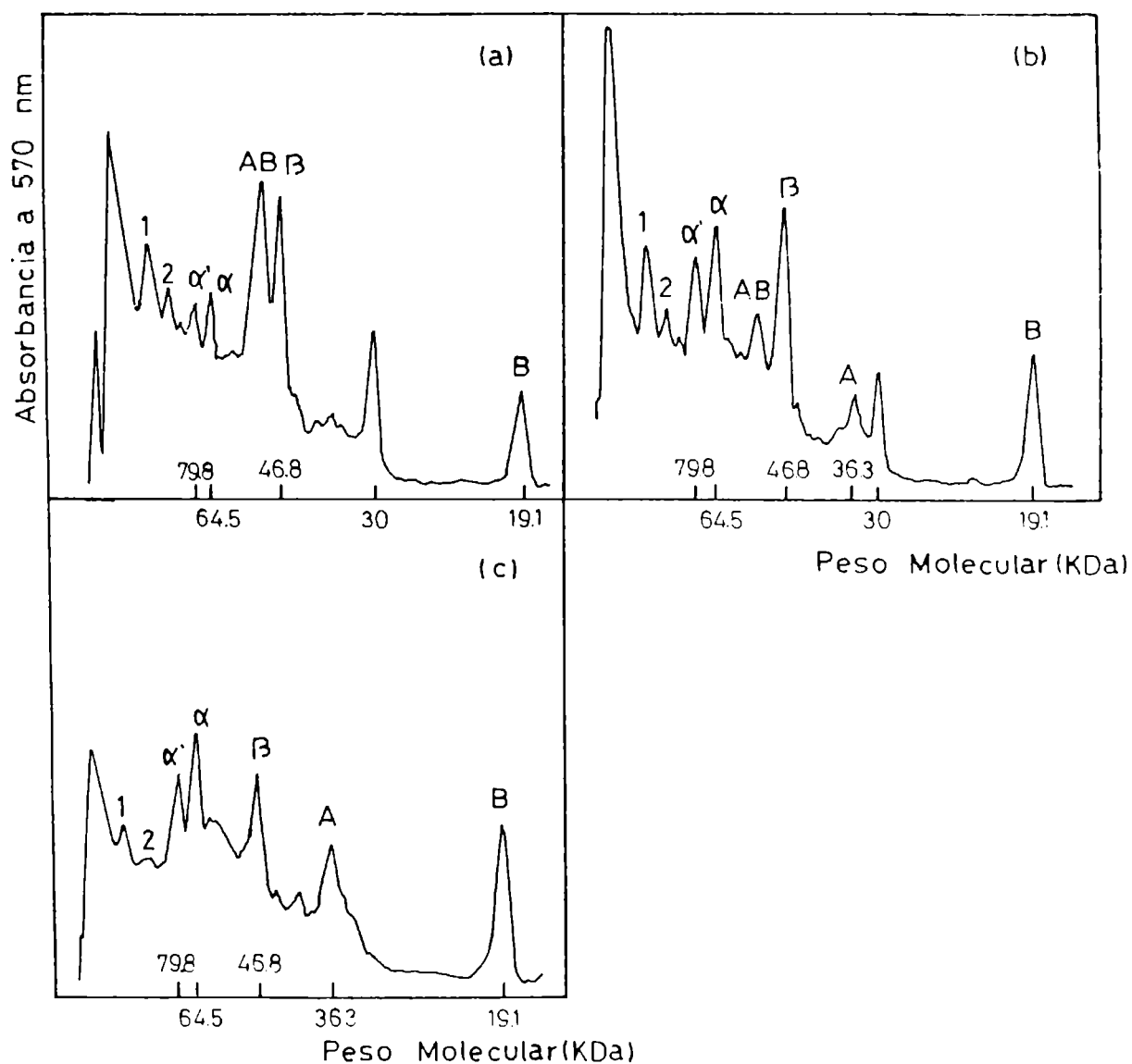
Ya se señaló que la proteína 11S posee entre 1,6 y 5,6 grupos SH libres por molécula; entonces, considerando el valor promedio del contenido de proteína de un aislado y el de proteína 11S, resulta que el valor estimado del contenido de grupos SH libres varía entre 1,83-6,40  $\mu\text{mol/g}$  de proteína. Se puede observar que la mayoría de las muestras del grupo B se encuentran dentro del rango del valor estimado de SH libres, mientras que las muestras del grupo A presentan valores inferiores al mismo.

Con el objeto de poder interpretar estos resultados, desde el punto de vista de la estructura que presentan las proteínas de los distintos aislados proteicos de soja, se realizaron análisis electroforéticos, en ausencia de 2-mercaptoetanol, de los aislados proteicos disueltos en buffer urea, buffer empleado en la determinación de grupos sulfhidrilos.

#### **3.1.4.2. Análisis de las muestras con distinto contenido de grupos SH libres mediante SDS-PAGE sin tratamiento previo con 2-mercaptoetanol**

En la Figura 5 se mostró que cuando los aislados se solubilizan en buffer urea y se analizan electroforéticamente en presencia de 2-mercaptoetanol todas las muestras presentan el mismo tipo de comportamiento y en los geles aparecen las bandas correspondientes a las subunidades y polipéptidos de las proteínas 7S y 11S.

Sin embargo, cuando la SDS-PAGE, de las mismas muestras, se realizó sin 2-mercaptoetanol se encontraron tres tipos de perfiles electroforéticos característicos. En todos los aislados del grupo A (contenido de SH libres  $< 1 \mu\text{mol/g}$ ) se observó el perfil que se muestra en la Figura 8a. Las principales especies proteicas que aparecen son las subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$ , y  $\beta$  de la proteína 7S y otra de 55 kDa. De acuerdo a los resultados obtenidos por



**Figura 8:** Densitogramas de SDS-PAGE sin 2-mercaptoetanol de aislados proteicos de soja solubilizados en buffer urea. a: muestra 4; b: muestra 15; c: muestra 18.  $\alpha'$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ : subunidades de la proteína 7S; AB: subunidad de la proteína 11S; A y B: polipéptidos de la proteína 11S; 1 y 2 agregados proteicos.

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

Kitamura y col. (1976; 1977) y Mori y col. (1979) esta especie fue descrita como una "subunidad intermedia o IS". Teniendo en cuenta la estructura de la proteína 11S ya discutida, esta subunidad intermedia corresponde a la subunidad AB.

En la Figura 8b se puede observar el perfil correspondiente a la muestra 15. Este aislado de soja perteneciente al grupo B, es el que posee el menor contenido de SH libres del grupo. Se puede observar en el perfil electroforético, que además de las especies proteicas presentes en las muestras del grupo A, también aparecen los picos correspondientes a los polipéptidos A y B. Esto indica que en el aislado 15 las uniones disulfuro intersubunidades de la proteína 11S se encuentran parcialmente reducidas.

El perfil electroforético característico de las muestras restantes del grupo B (alto contenido de SH libres) se presenta en la Figura 8c, donde se visualizan los picos correspondientes a las subunidades de la proteína 7S y los polipéptidos A y B de la proteína 11S, desapareciendo el pico de la subunidad intermedia IS. La ausencia de esta subunidad podría deberse a dos causas diferentes: - que las uniones disulfuro intersubunidades de IS hayan sido totalmente reducidas lo que originaría la aparición de los polipéptidos A y B; - que las IS se hayan agregado formando componentes de alto peso molecular que no penetren en el gel. Los diagramas electroforéticos obtenidos (Figura 8c) muestran tanto la presencia de los polipéptidos A y B como la formación de agregados (picos 1 y 2). Si además se comparan los perfiles electroforéticos mostrados en las Figuras 5 y 8c, se observa en esta última que la cantidad de los polipéptidos A y B presentes es inferior a la esperada si hubiera existido reducción total de uniones disulfuro. Por consiguiente es probable que a los aislados pertenecientes al grupo B se les hayan reducido sus puentes disulfuro y hayan además sufrido reoxidaciones que condujeron a la formación de agregados de alto peso molecular que no penetran en el gel.



### **3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL**

En todas las muestras se observó además de las especies proteicas correspondientes a las proteínas 7S y 11S la presencia de otros componentes de mayor peso molecular (picos 1 y 2). En los aislados del grupo A y en el aislado 15 también se detectó un pico de 30,2 kDa. Todos estos componentes no aparecieron cuando la electroforesis se realizó en presencia de 2-mercaptoetanol (Figura 5). Esto indica que dichas especies proteicas estarían constituidas por subunidades unidas por uniones disulfuro que probablemente se hayan formado durante el proceso de obtención de los aislados debido a reacciones de reoxidación e intercambio entre residuos de cisteína de las subunidades de las proteínas mayoritarias de los aislados de soja.

#### **3.1.4.3. Comparación entre los resultados del contenido de grupos sulfhidrilos libres y los perfiles electroforéticos**

Al comparar los resultados obtenidos en la determinación del contenido de grupos sulfhidrilos libres con los perfiles electroforéticos de los aislados solubilizados en buffer urea, con o sin tratamiento con 2-mercaptoetanol, surgen los siguientes hechos: las muestras del grupo B, que tienen uniones disulfuro interpolipéptidos reducidas, presentan los valores más altos de grupos SH libres, en tanto que los aislados del grupo A, cuyas uniones interpolipéptidos se mantienen, presentan menores contenidos de SH libres. No obstante, los valores de SH libres correspondientes a los aislados del grupo B, acorde a los perfiles electroforéticos, deberían haber sido superiores al valor estimado dado que las uniones interpolipéptidos se hallan parcial o totalmente reducidas. Sus contenidos deberían haberse aproximado al valor de SH totales. Es lógico pensar entonces, que no todos los grupos SH de las proteínas de esos aislados, provenientes de la reducción de uniones disulfuro, se hallan libres. Contrariamente, deben encontrarse bloqueados o formando nuevas uniones, distintas a las existentes en

las proteínas nativas, de manera que no podrían ser detectados por el reactivo de Ellman.

Finalmente se puede concluir que si bien las diferencias en el contenido de SH libres de los grupos A y B no son muy grandes, reflejan diferencias importantes en el estado estructural de las proteínas. Además, es evidente que durante el proceso de obtención de los aislados se ven favorecidas reacciones de oxidación o reoxidación de los grupos SH que conducen a nuevas estructuras proteicas y a la formación de agregados.

Si ahora se comparan los resultados obtenidos en la determinación de grupos sulfhidrilos con los perfiles electroforéticos correspondientes a las fracciones solubles en agua de los distintos aislados (Tabla V y VI) se observa que: los aislados que integran los grupos I, II y V (establecidos de acuerdo a los resultados de electroforesis) son los mismos que conforman el grupo A (establecido en base al contenido de SH libres); mientras que las muestras de los aislados del grupo III y IV pertenecen al grupo B. Esto indica claramente que la reducción de uniones disulfuro de la proteína 11S tiene una consecuencia directa sobre el tipo de agregados formados. Se ha visto que, a medida que aumenta el grado de desnaturalización proteica de los aislados se incrementa la formación de agregados  $\beta$ -7S/B-11S (Figura 6, Tabla IV) y coincidentemente también aumenta el contenido de SH libres. Ambos resultados son concordantes ya que la disociación de la subunidad intermedia AB posibilitaría la interacción del polipéptido B-11S con la subunidad  $\beta$ -7S.

#### 3.1.5. Determinación de la hidrofobicidad superficial

La hidrofobicidad superficial ( $S_0$ ) de las proteínas de los aislados comerciales de soja solubles en agua se determinó fluorimétricamente de

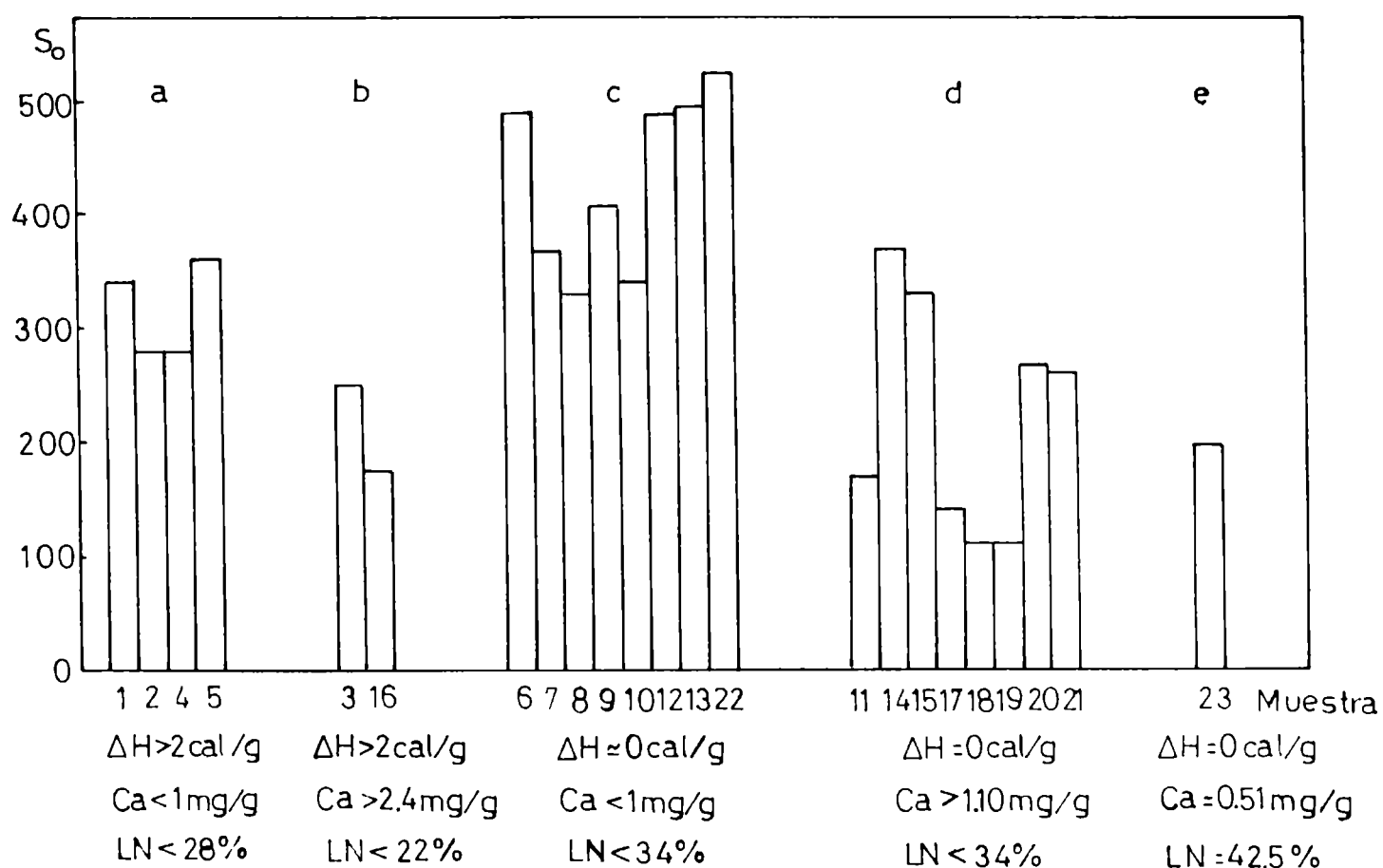
### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

acuerdo a la técnica desarrollada por Kato y Nakai (1980). En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos. Analizando esos valores se observó que las muestras se podían ordenar en cinco grupos (a, b, c, d y e) teniendo en cuenta el grado de desnaturalización, el contenido de calcio y el de lípidos neutros.

Se puede observar que los aislados cuyas proteínas mantienen parcialmente el estado nativo (a) tienen menor  $S_0$  que las muestras con alto grado de desnaturalización proteica (c). Este resultado es concordante con el hecho que la proteína cuando se desnaturaliza se despliega y los grupos hidrofóbicos que se hallaban en el interior de la molécula, y por los cuales el marcador fluorescente tiene alta afinidad, quedan expuestos pudiendo interactuar con el mismo. Por lo tanto, la hidrofobicidad superficial aumenta con la desnaturalización proteica.

También se observó que la presencia de calcio hace disminuir la  $S_0$ , tanto en los aislados con proteínas nativas (a y b) como en los grupos cuyas proteínas están desnaturalizadas (c y d). Este resultado sugiere que o bien el ion calcio interactúa con las proteínas ocupando sitios hidrofóbicos o su presencia promueve la agregación de las moléculas, siendo la disminución de la  $S_0$  debida a interacciones hidrofóbicas proteína-proteína.

Por último se observó que el aislado 23, cuyas proteínas están totalmente desnaturalizadas y su contenido de calcio es reducido, presenta una  $S_0$  baja. En este caso la disminución de  $S_0$  podría estar relacionada con el contenido en lípidos neutros. Los mismos interactuarían con las proteínas mediante uniones hidrofóbicas lo cual reduce la proporción de sitios a los que se une el marcador fluorescente; consecuentemente la  $S_0$  detectada es menor.



**Figura 9:** Hidrofobicidad superficial ( $S_0$ ) de los aislados proteicos de soja. a: aislados con mayor contenido de proteína nativa y bajo contenido de Ca; b: aislados con mayor contenido de proteína nativa y alto contenido de Ca; c: aislados con proteína desnaturalizada y bajo contenido de Ca; d: aislados con proteína desnaturalizada y alto contenido de Ca; e: aislado con proteína desnaturalizada y alto contenido de lípidos neutros.

#### **3.2. PROPIEDADES FUNCIONALES**

##### **3.2.1. Solubilidad**

##### **3.2.1.1. Relación entre la solubilidad y el grado de desnaturalización proteica**

En la Tabla VII se muestran los valores de la solubilidad en agua destilada de las proteínas de los aislados comerciales de soja. Se puede observar que los aislados 1, 2, 4 y 5, que presentaron los máximos valores de  $\Delta H$ , tienen alta solubilidad (valores superiores al 50%) mientras que otros aislados con  $\Delta H = 0$  cal/g (15, 17, 18, 19, 20, 21 y 23) exhiben solubilidades menores que el 50%. Esta observación se corresponde con el comportamiento esperado para proteínas desnaturalizadas. La desnaturalización de las proteínas globulares, tal como se indicara anteriormente, implica el desplegamiento de la cadena polipeptídica; los grupos hidrofóbicos ubicados originariamente en el interior de la molécula quedan expuestos al medio pudiendo así interactuar con el solvente. Consecuentemente, este hecho conlleva una disminución de la solubilidad de la proteína dado que las interacciones entre grupos hidrofóbicos son energéticamente más favorables que las interacciones entre los grupos no polares y el agua (Frank y Evans, 1945; Kauzman, 1959); por lo tanto las proteínas desnaturalizadas tienden a agregarse.

A diferencia de la apreciación anterior, se observa que algunos aislados de soja con alto grado de desnaturalización, como son las muestras 6, 7, 10, 12, 13 y 22, exhiben altos valores de solubilidad y que el aislado 16, cuyas proteínas están parcialmente desnaturalizadas, es poco soluble en agua. Estos resultados indican que en el caso de los aislados comerciales de soja no es posible correlacionar la disminución de la solubilidad con la desnaturalización proteica. Otros factores, más allá de la desnaturalización tienen una importancia crítica sobre la solubilidad.

**3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL**

**TABLA VII:** Solubilidad en agua de las proteínas de los aislados comerciales de soja

Aislado	Solubilidad (%)	Aislado	Solubilidad (%)
1	83,6	13	83,8
2	73,8	14	45,5
3	47,2	15	27,7
4	54,7	16	7,7
5	57,8	17	29,7
6	68,1	18	27,9
7	61,0	19	24,8
8	44,0	20	20,6
9	36,3	21	36,5
10	58,0	22	75,1
11	48,1	23	29,9
12	59,0		

Los valores se expresaron como porcentaje (p/p) del contenido de proteína total del aislado y fueron determinados el 1.6.1988.

LSD<sub>0,05</sub>: 0,23

### **3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL**

#### **3.2.1.2. Comparación entre la solubilidad en NaCl 0.2M y en agua destilada**

En la Figura 10 se comparan las solubilidades de los aislados de soja en agua destilada y en NaCl 0,2M. Todos los aislados, excepto la muestra 16, presentaron menor solubilidad en la solución salina, resultado coincidente con lo informado por otros autores (Hermansson, 1978; Shen, 1976). Esto indica que el NaCl 0,2M promueve la agregación de las proteínas de los aislados comerciales de soja, o sea que tiene un efecto "salting-out".

La muestra 16, la cual es más soluble en NaCl 0,2M, posee un contenido de calcio mucho más elevado que los aislados restantes. Es probable que la combinación de iones (Na-Ca) invierta el efecto "salting-out" del NaCl.

#### **3.2.1.3. Efecto del calcio en la solubilidad de las proteínas de soja**

Los aislados comerciales de proteínas de soja estudiados se pueden diferenciar en tres clases de acuerdo al contenido de calcio que poseen (Tabla II):

- 1) aislados 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 22 y 23 con contenidos de calcio menores que 1 mg de Ca/g de aislado.
- 2) aislados 3, 11, 14, 15, 17, 18, 19, 20 y 21 cuyos valores caen entre 1,10 y 2,40 mg/g.
- 3) aislado 16 que posee 10,4 mg/g.

Si se analiza la incidencia del contenido de calcio de los aislados sobre su solubilidad en agua (Tablas II y VII) se observa que cuanto mayor es el contenido de calcio menor es la solubilidad, representando el aislado 16 la situación extrema.

Anteriormente se mencionó que el estado conformacional de las proteínas, de los distintos aislados analizados, no era un parámetro suficiente para explicar *per se* la solubilidad de los mismos en agua. Si se comparan

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

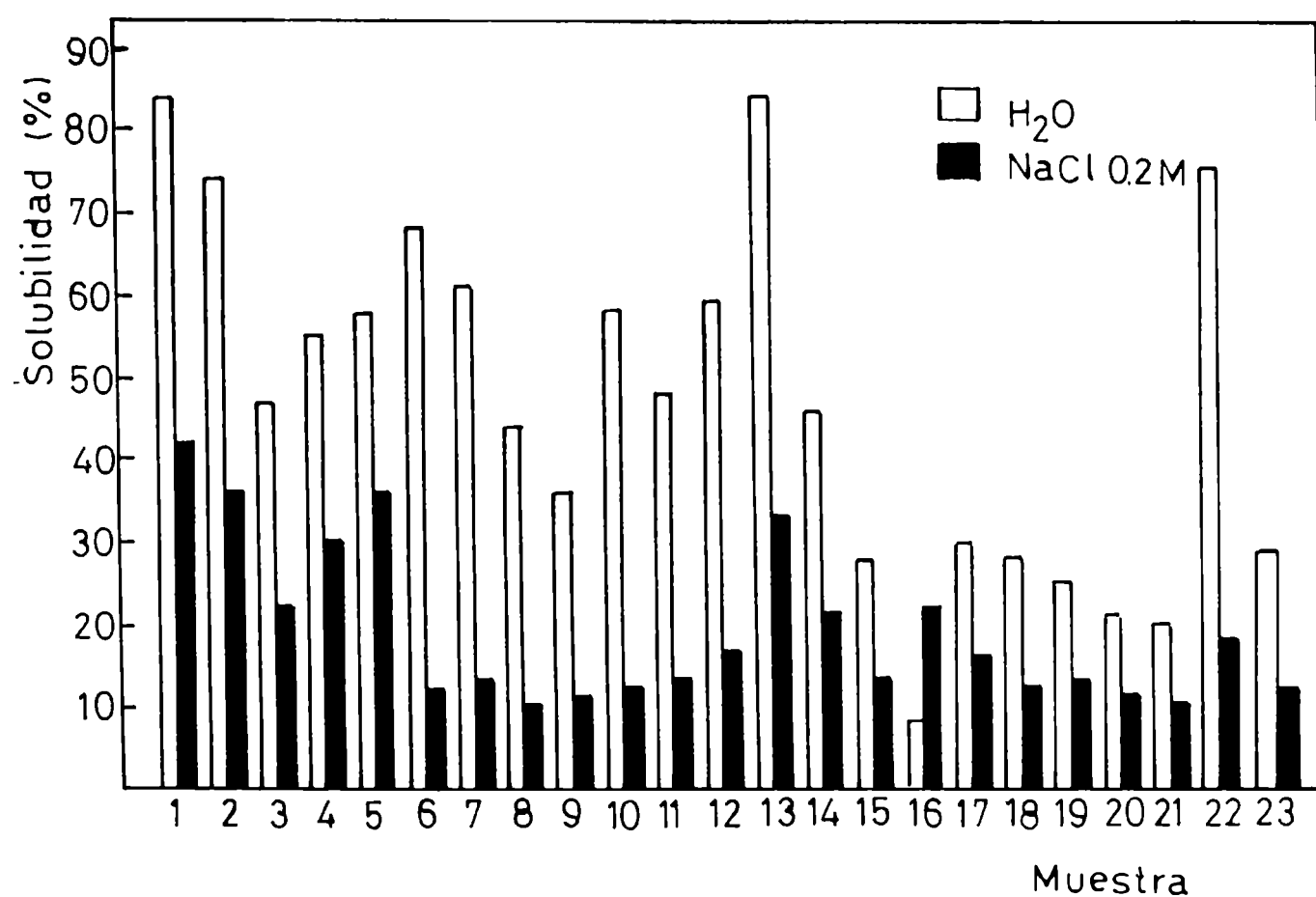


Figura 10: Solubilidad de las proteínas presentes en los aislados comerciales de soja en agua destilada y en NaCl 0,2M.



### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

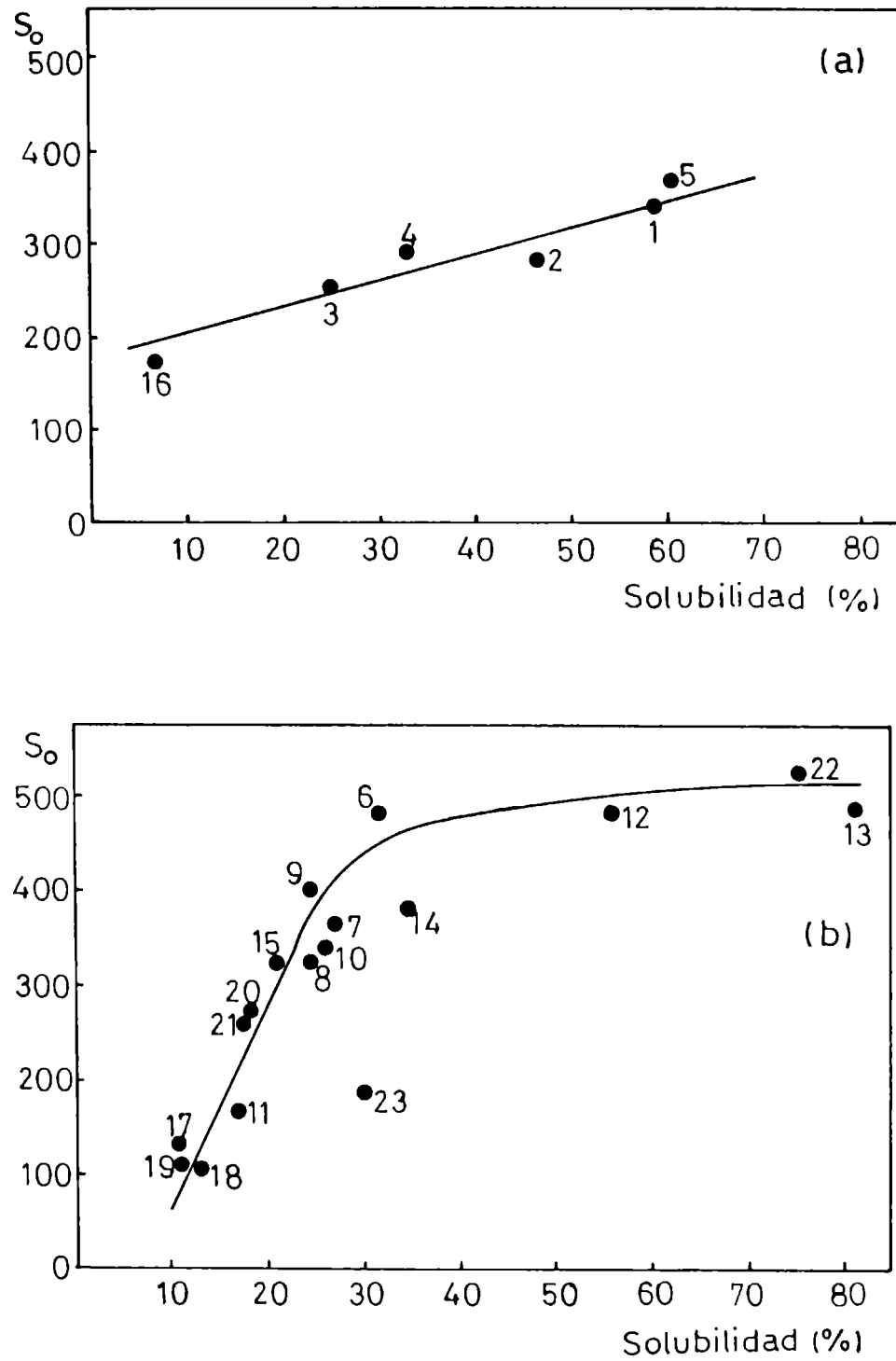
los valores de solubilidad de los aislados 1, 2, 3, 4, 5 y 16, todos los cuales poseen proteínas nativas, se observa que la solubilidad disminuye a medida que aumenta el contenido de calcio. Igual comportamiento exhiben los aislados que poseen proteínas desnaturalizadas. En base a ello se puede concluir que la presencia de calcio en cantidades superiores a 0,9 mg de Ca/g aislado afecta la solubilidad de las proteínas. Este hecho sería atribuible al efecto "puente" entre moléculas que ejerce el calcio por ser un ión divalente, y que provoca la agregación de proteínas. Debe destacarse además que este efecto es más pronunciado en el caso de proteínas desnaturalizadas donde para un contenido determinado de calcio la disminución de solubilidad es mayor.

#### 3.2.1.4. Relación entre la solubilidad y la hidrofobicidad superficial

Cuando se graficó la hidrofobicidad superficial ( $S_o$ ) en función de solubilidad en agua de las muestras estudiadas, se distinguieron dos tipos de comportamientos: uno fue el que presentan los aislados con proteínas nativas (1, 2, 3, 4, 5 y 16) y otro el que mostraron los aislados cuyas proteínas habían sido parcial o totalmente desnaturalizadas (Figura 11).

En el caso de las proteínas nativas (Figura 11a) se encontró una correlación lineal entre el aumento de la solubilidad y el aumento de la  $S_o$ , o lo que es lo mismo, una disminución en la  $S_o$  se corresponde con una menor solubilidad. Previamente se indicó que la disminución en la  $S_o$  estaba relacionada con el aumento de interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de proteínas, las cuales estabilizan la formación de agregados. Una disminución de la solubilidad implica un aumento de la proporción de proteínas agregadas. El hecho que la  $S_o$  de las proteínas solubles correspondientes a aislados con una baja solubilidad en agua sea menor que la  $S_o$  de las

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL



**Figura 11:** Hidrofobicidad superficial ( $S_o$ ) de los aislados proteicos de soja estudiados en función de su solubilidad. a: aislados con mayor contenido de proteínas nativas; b: aislados con proteínas desnaturalizadas. Los números representan las diferentes muestras analizadas.

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

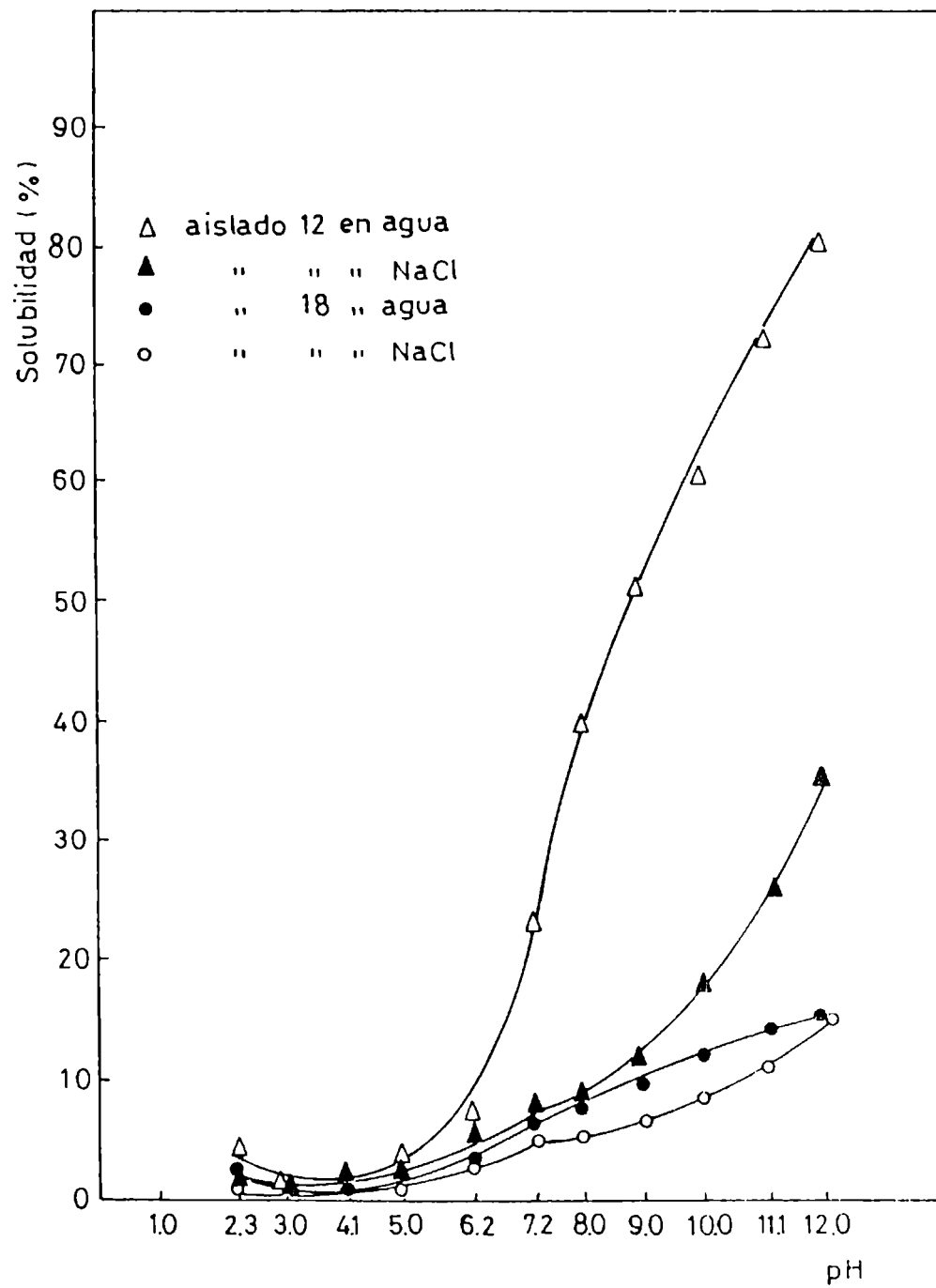
proteínas solubles de aislados de mayor solubilidad indica la presencia, en el primer caso, de una mayor proporción de agregados solubles.

En el caso de las proteínas desnaturalizadas se observó que la  $S_0$  aumenta a medida que la solubilidad aumenta, manteniéndose constante a partir de un valor de solubilidad de aproximadamente 40% (Figura 11b). Estos resultados sugieren una disminución de la interacción de las proteínas solubles a medida que aumenta la solubilidad hasta alcanzar el 40%, a partir de entonces o la interacción proteica es nula o permanece constante con el aumento de la solubilidad.

#### 3.2.1.5. Variación de solubilidad con el pH

En general se busca que las proteínas de los aislados proteicos de soja posean una buena solubilidad en agua porque así se garantiza que otras propiedades funcionales como la gelificación, la emulsificación o la capacidad de espumado sean óptimas. De acuerdo a Kinsella (1979) proteínas con baja solubilidad son de aplicabilidad limitada. Sin embargo, nuestros resultados muestran que a varios de los aislados de soja estudiados se les adicionó calcio durante el proceso de obtención reduciéndoles así la solubilidad. Evidentemente, deben existir otros motivos más importante que la solubilidad que justifique ese procedimiento.

A efectos de obtener alguna respuesta en tal sentido, se compararon las solubilidades de dos aislados con distinto contenido de calcio (muestras 12 y 18) a distintos pH en buffer con o sin NaCl 0,2M. En la Figura 12 se muestra que el comportamiento de la solubilidad en agua de ambos aislados es completamente diferente. En el aislado 12 la solubilidad varía en forma muy pronunciada en el rango de pH 6-12, mientras que en el otro aislado la variación es mucho menor. Esto implica que el aislado 18 es más



**Figura 12:** Variación de la solubilidad de las proteínas de los aislados proteicos 12 y 18 en función del pH.

### **3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL**

versátil puesto que puede emplearse en alimentos con distintos pH sin que se modifique mayormente la propiedad funcional aportada.

Este comportamiento es probable que se vincule con la presencia de calcio. Previamente se indicó que los puntos isoeléctricos de los componentes de las proteínas de soja son:  $pI_{\alpha} = 4,9$ ;  $pI_{\alpha'} = 5,2$ ;  $pI_{\beta} = 5,7$ ;  $pI_A = 4,8-5,4$  y  $pI_B = 8,0-8,5$  y que las proteínas presentan la mínima solubilidad a  $pH = 4,5$ . Por lo tanto, en el rango de  $pH$  6-12 las proteínas estarán cargadas negativamente. A medida que el  $pH$  aumenta las proteínas del aislado 12 (bajo contenido de calcio) se cargan más negativamente con lo cual la repulsión entre moléculas aumenta y consecuentemente aumenta la solubilidad. En el aislado 18 el incremento de la carga negativa con el  $pH$  se vería apantallado por el  $Ca^{+2}$  que interacciona con los grupos cargados negativamente de las proteínas. Por lo tanto a medida que el  $pH$  aumenta la variación de la solubilidad sería menos notable.

Además se observó que en el aislado 18 la presencia de NaCl no modifica la solubilidad, hecho que no se repite para el aislado 12. Este comportamiento amplía lo dicho previamente respecto de la mayor versatilidad del aislado con mayor contenido de calcio.

#### **3.2.1.6. Comportamiento de la solubilidad en relación a la hidrofobicidad del aislado total**

En la Figura 13 se observa que la solubilidad se relaciona con la hidrofobicidad del aislado total determinada por la unión de SDS, según al método de Kato y col. (1984). Se encontró que los aislados de mayor hidrofobicidad total son los que presentan mayor solubilidad. La solubilidad refleja el estado de agregación de las proteínas siendo los aislados menos solubles los que tienen una mayor proporción de proteínas agregadas. En la determinación de la hidrofobicidad total se puede suponer que los agregados

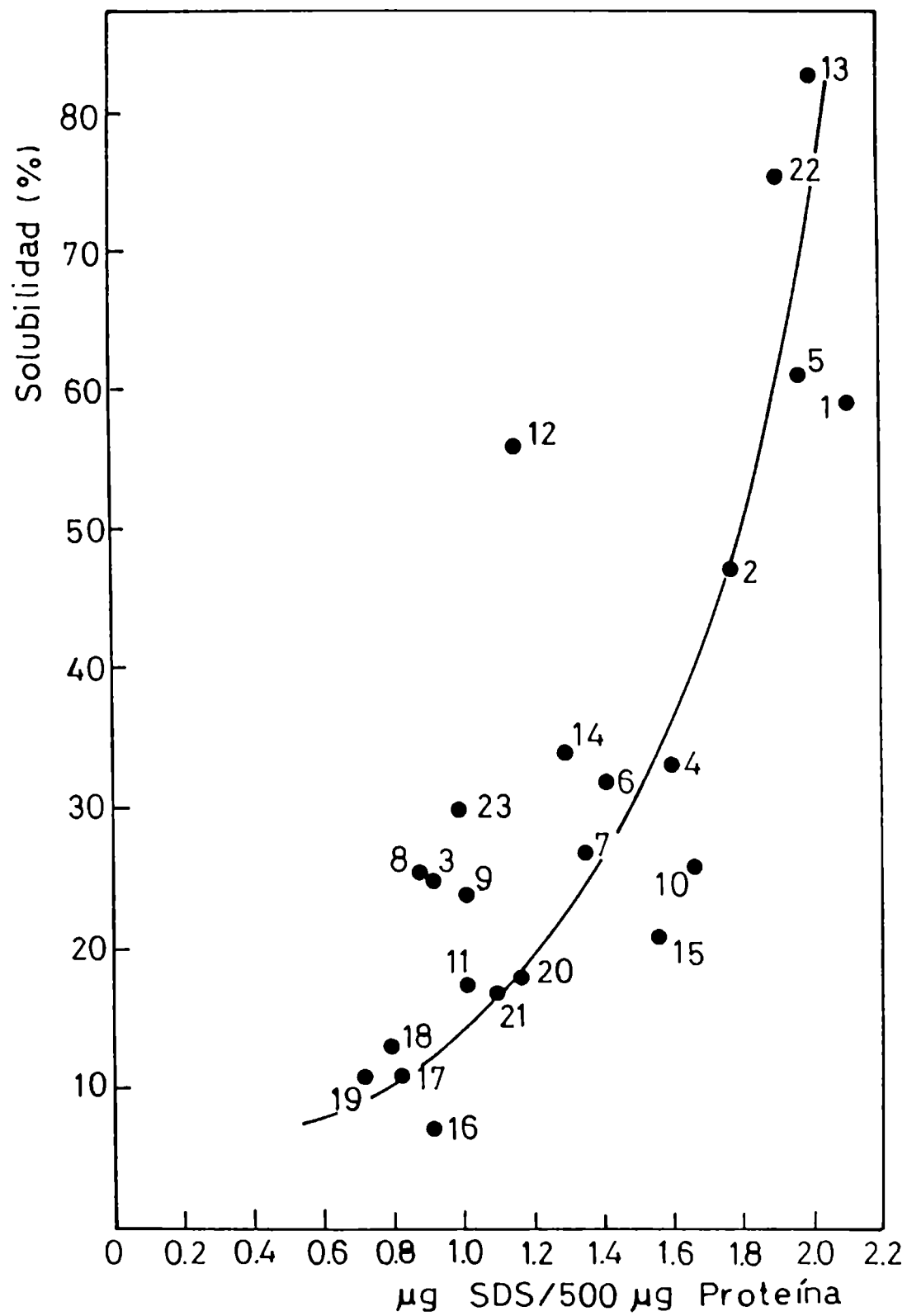


Figura 13: Relación entre la solubilidad de las proteínas y la hidrofobicidad del aislado total determinada por la unión de SDS. Los números representan las diferentes muestras analizadas.

insolubles, presentes en los aislados, permanecen como tal dado que, para la suspensión de las muestras, se emplean condiciones suaves como es el buffer fosfato 0,01M con SDS 0,07mM. Entonces, el comportamiento observado se relacionaría con el hecho que los aislados que poseen las proteínas más desagregadas, es decir las más solubles, unen más cantidad de SDS que las proteínas cuyo estado de agregación es mayor. Las proteínas de los agregados se mantienen unidas a través de interacciones no covalentes, entre las cuales las interacciones hidrofóbicas son muy importantes. Por lo tanto, en las proteínas que se encuentran formando agregados el número de sitios hidrofóbicos libres que pueden interactuar con el SDS es menor. Consecuentemente la hidrofobicidad total de las proteínas de los aislados menos solubles será menor.

#### 3.2.1.7. Modificación de la solubilidad por almacenamiento

Los aislados comerciales de proteínas de soja, durante el desarrollo de este estudio, se almacenaron en cámara a 4°C. Periodicamente se determinó la solubilidad proteica de los mismos en agua. En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos de 21 muestras que fueron las que se dispusieron desde que se comenzó el trabajo. Se puede observar que la solubilidad en la mayoría de los aislados disminuye con el transcurso del tiempo, lo que indicaría que durante el almacenamiento la agregación de las proteínas está favorecida. En el caso de los aislados 5, 12, 13, 15, 16 y 20 la solubilidad se mantuvo constante. Estos aislados presentan los contenidos de triglicéridos más altos, los cuales podrían influir en el mantenimiento de la solubilidad.

También se observó que la entalpía de desnaturalización de los diferentes aislados disminuyó durante el almacenamiento (Tabla VIII). Este resultado indica que las condiciones de conservación empleadas favorecen la

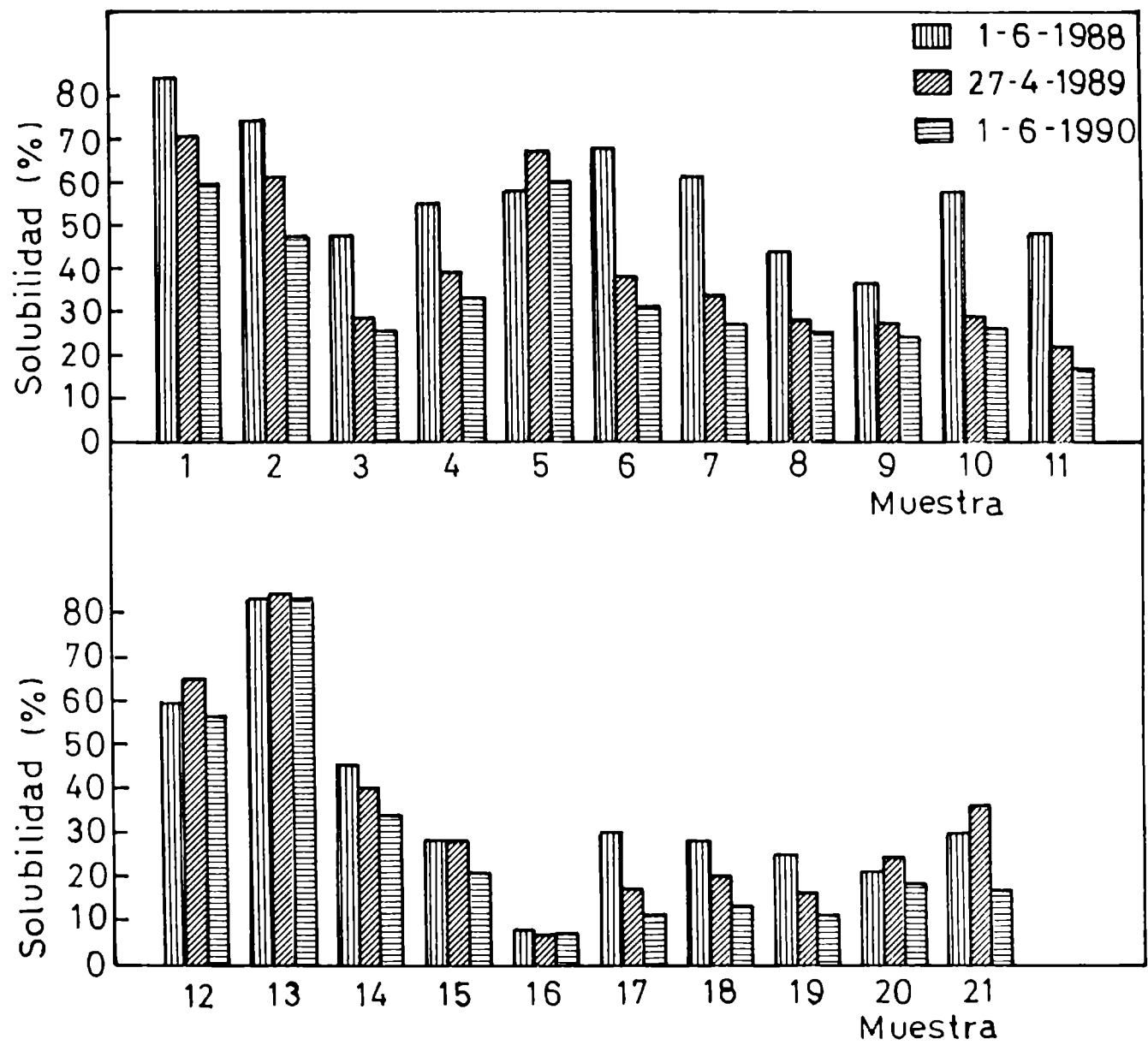


Figura 14: Variación de la solubilidad de las proteínas de los aislados proteicos de soja por almacenamiento.



**3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL**

**TABLA VIII:** Disminución de la entalpía de desnaturalización ( $\Delta H$ ) de las proteínas de soja durante el almacenamiento

Aislado	$\Delta H^1$ (cal/g)	$\Delta H^2$ (cal/g)
1	2,85	1,5
2	2,53	1,3
3	1,65	0,8
4	2,30	1,2
5	2,16	1,6
6	0,60	0
7	0,65	0
8	0,45	0
9	0,30	0
10	0,085	0
11	0,081	0
12	0,30	0
13	0,10	0
16	2,63	1,1

(1) Valores determinados en junio de 1988.

(2) Valores determinados en diciembre de 1989.

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

desnaturalización de las proteínas o bien su agregación, ambos procesos detectables por DSC como una disminución del área de las correspondientes endotermas. Teniendo en cuenta la disminución de la solubilidad observada y considerando que las condiciones de almacenamiento no tendrían por qué desnaturalizar a las proteínas la disminución de la entalpía de desnaturalización observada sería atribuible a un aumento durante el almacenamiento de la tendencia a la agregación.

#### 3.2.2. Capacidad de absorción de agua (WIC)

##### 3.2.2.1. Resultados de la determinación

Los valores de WIC determinados para los aislados de proteínas de soja estudiados se muestran en la Tabla IX. Como se puede observar, las muestras 6, 7, 8, 10 y 12 que se caracterizan por tener un alto grado de desnaturalización proteica, sin que éste llegue a ser total ( $\Delta H = 0,085-0,65$  cal/g) son los aislados que mostraron los máximos valores de WIC. Tanto los aislados que poseen una alta proporción de proteínas en estado nativo (1, 2, 3, 4, 5, 16) como aquellos cuyas proteínas están totalmente desnaturalizadas presentaron valores de WIC más bajos. De acuerdo a estos resultados para obtener una matriz proteica capaz de absorber y retener agua sería necesario que las cadenas polipeptídicas alcancen cierto desplegamiento.

Se puede observar que el aislado 13, el cual posee un grado de desnaturalización comparable al de las muestras 10 o 12, posee un valor de WIC bastante menor que ellas. Este comportamiento podría ser atribuible al elevado valor de la solubilidad del aislado 12 (84%) que impediría el mantenimiento de la matriz proteica. Por otra parte, la muestra 9 teniendo el mismo  $\Delta H$  que la 12 posee una menor WIC, atribuible a su menor solubilidad. Se puede observar además, que el aislado 16 presenta el menor valor, tanto de

3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

TABLA IX: Capacidad de absorción de agua (WIC) de los aislados comerciales de proteínas de soja

Aislado	WIC	Aislado	WIC
1	5,8	13	6,7
2	6,2	14	7,3
3	6,0	15	7,6
4	7,8	16	1,9
5	5,2	17	8,8
6	12,2	18	7,8
7	11,0	19	6,4
8	10,6	20	8,1
9	9,4	21	8,0
10	12,8	22	7,8
11	8,3	23	9,3
12	11,6		

Los valores de WIC se expresaron en ml de agua embebida/g de aislado.

LSD<sub>0,05</sub>: 0,10.

solubilidad como de WIC; sin embargo sus proteínas poseen un estado conformacional equivalente al de los aislados 1, 2, 3, 4 y 5 cuyas WIC son sensiblemente mayores. Estos resultados sugieren que el grado de desnaturalización proteica y la solubilidad son dos parámetros fundamentales de los aislados de soja en relación a la capacidad que presentarían sus proteínas para formar una estructura capaz de absorber y retener agua.

#### **3.2.2.2. Incidencia del grado de desnaturalización y de agregación en la capacidad de absorción de agua**

A efectos de determinar qué factores tienen más incidencia en la capacidad de absorción de agua de los aislados proteicos de soja, se analizaron los extractos acuosos, obtenidos en tres etapas consecutivas, y la fracción insoluble remanente correspondientes a diez muestras. La Tabla X muestra los porcentajes de proteína extraídos en cada etapa. Se puede observar, que con excepción de la muestra 5, la mayor proporción de proteínas se extrae en el primer lavado.

En la Tabla XI se muestran los valores de WIC del aislado dispersado en agua y posteriormente liofilizado y la suma de las contribuciones de todas las fracciones a la WIC total. Los resultados obtenidos muestran que la liofilización altera los valores de WIC pero en una proporción que no supera el 25%. Estas diferencias pueden ser atribuidas no sólo al proceso de liofilización sino también a la molienda posterior del liofilizado que modifica el tamaño de las partículas del polvo obtenido. Sin embargo, estas modificaciones de los valores de WIC no alteran el comportamiento relativo de las muestras.

La Figura 15 muestra que la fracción insoluble de todos los aislados es la que posee mayor WIC y también la que más contribuye a la WIC del

3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

TABLA X: Porcentaje de proteínas extraído en las etapas I, II y III y en la fracción insoluble de los aislados proteicos de soja.

Muestra	% proteína <sup>(a)</sup>				Fracción insoluble
	Extractos			Σ extractos	
	I	II	III		
1	35,7	18,5	12,4	66,6	33,4
2	35,4	17,4	13,0	66,2	33,8
3	14,5	4,9	3,6	23,0	77,0
4	25,0	6,1	8,3	39,4	60,6
5	12,6	10,1	12,2	34,9	65,1
6	20,6	4,3	3,9	27,8	72,2
11	14,4	4,4	1,2	20,0	80,0
12	25,6	9,4	4,8	39,7	60,3
13	48,9	14,7	7,0	70,7	29,3
19	10,1	3,4	0,9	14,4	85,6

(a) Los valores se expresaron como porcentaje (p/p) del contenido de proteína total del aislado.

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

**TABLA XI:** Capacidad de absorción de agua (WIC) de los aislados comerciales, de los aislados liofilizados y la WIC calculada como la suma de las contribuciones de las diferentes fracciones.

WIC <sup>(a)</sup>			
Muestra	Aislado comercial	Aislado liofilizado	Σ <sup>(b)</sup>
1	5,7	5,9	6,7
2	6,0	4,6	4,4
3	5,8	7,0	7,5
4	8,2	6,9	8,8
5	5,3	5,1	5,8
6	11,3	8,8	12,8
11	9,1	7,1	8,3
12	9,6	8,6	10,7
13	7,1	6,4	7,7
19	5,9	5,2	5,2

(a) Los resultados se expresaron en ml agua/g aislado.

(b)  $\Sigma = (P_I \text{ WIC}_I + P_{II} \text{ WIC}_{II} + P_{III} \text{ WIC}_{III} + P_{ins} \text{ WIC}_{ins})/100$  donde P es el porcentaje del contenido de proteína de los extractos I, II y III y fracción insoluble (ver Tabla X).

LSD<sub>0,05</sub> entre muestras: 0,10.

LSD<sub>0,05</sub> entre tratamientos: 0,23.

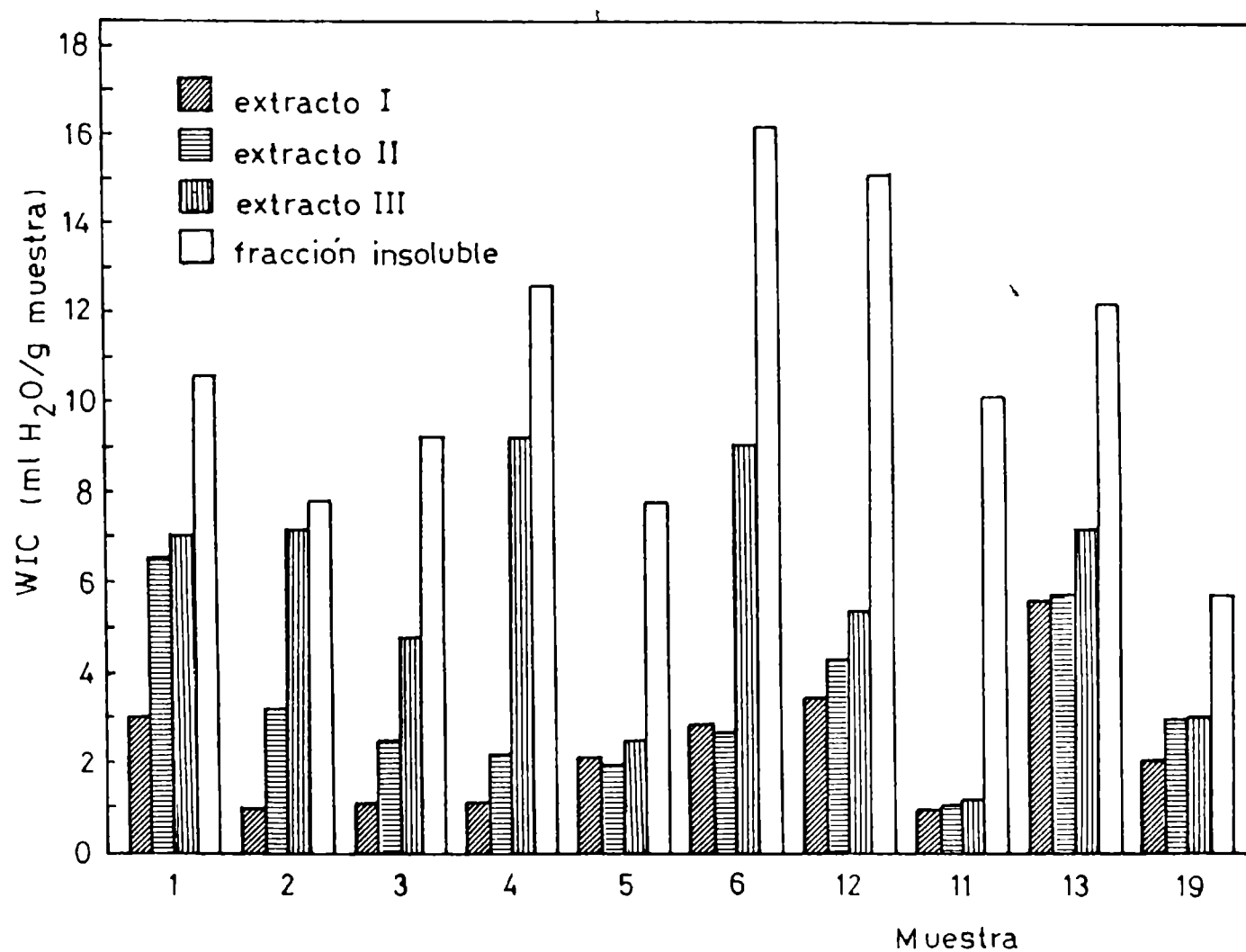


Figura 15: Capacidad de absorción de agua (WIC) de las fracciones liofilizadas de los aislados proteicos de soja.

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

aislado total (Figura 16). Esta contribución no es evidente en las muestras 1, 2 y 13 porque tienen bajo contenido de proteína insoluble.

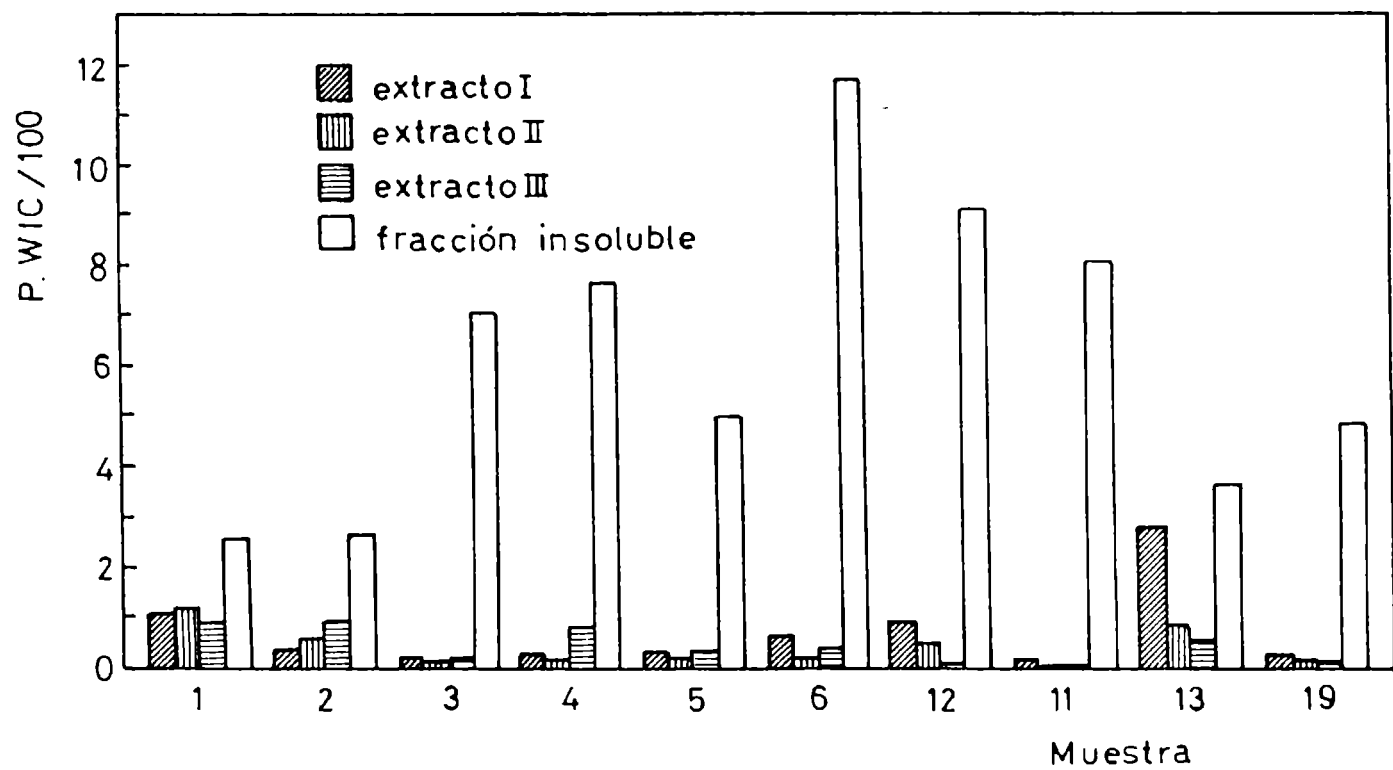
El valor de WIC total, calculado a partir de la suma de las contribuciones de cada fracción, resultó, en todos los casos, similar al valor determinado experimentalmente en el aislado (Tabla XI). Esto conduce a la conclusión que el comportamiento de las proteínas, en lo que a capacidad de absorción de agua concierne, es similar en el aislado total y en las diferentes fracciones obtenidas, tenidas en cuenta la solubilidad de cada una.

El grado de desnaturalización proteica de las diferentes fracciones obtenidas se analizó en los aislados 1 a 5, los que poseen el mayor contenido de proteína en estado nativo (Tabla IV). Los resultados obtenidos muestran que las áreas de las transiciones endotérmicas disminuyen gradualmente a medida que el número de lavados aumenta, correspondiendo el área más pequeña a la fracción insoluble (Figura 17). Este hecho indica que las proteínas más nativas se solubilizan principalmente en el primer lavado; resultado que concuerda con el comportamiento descrito para proteínas globulares referente a la pérdida de solubilidad asociada a la desnaturalización.

Previamente se indicó que algunos aislados con proteínas totalmente desnaturalizadas poseen una alta solubilidad, lo que sugieren resultados anteriores respecto a que otros factores más allá de la desnaturalización juegan un rol importante en lo que a solubilidad proteica se refiere.

En la Figura 18 se graficó la capacidad de absorción de agua de cada fracción en función de las áreas específicas respectivas obtenidas a partir de los termogramas de DSC. Se puede observar que el incremento de la proporción de proteínas desnaturalizadas (disminución del área específica) presente en las fracciones solubles a insoluble es acompañado por un aumento de la WIC. Este resultado indica que las proteínas desnaturalizadas contribuyen en mayor extensión a la capacidad de absorción de agua.





**Figura 16:** Contribución de la WIC de cada fracción a la WIC total. En el eje de las ordenadas se representa P.WIC donde P representa el porcentaje del contenido de proteína de los extractos I, II, III y de la fracción insoluble. WIC es la capacidad de absorción de agua expresada en ml H<sub>2</sub>O/g de muestra.

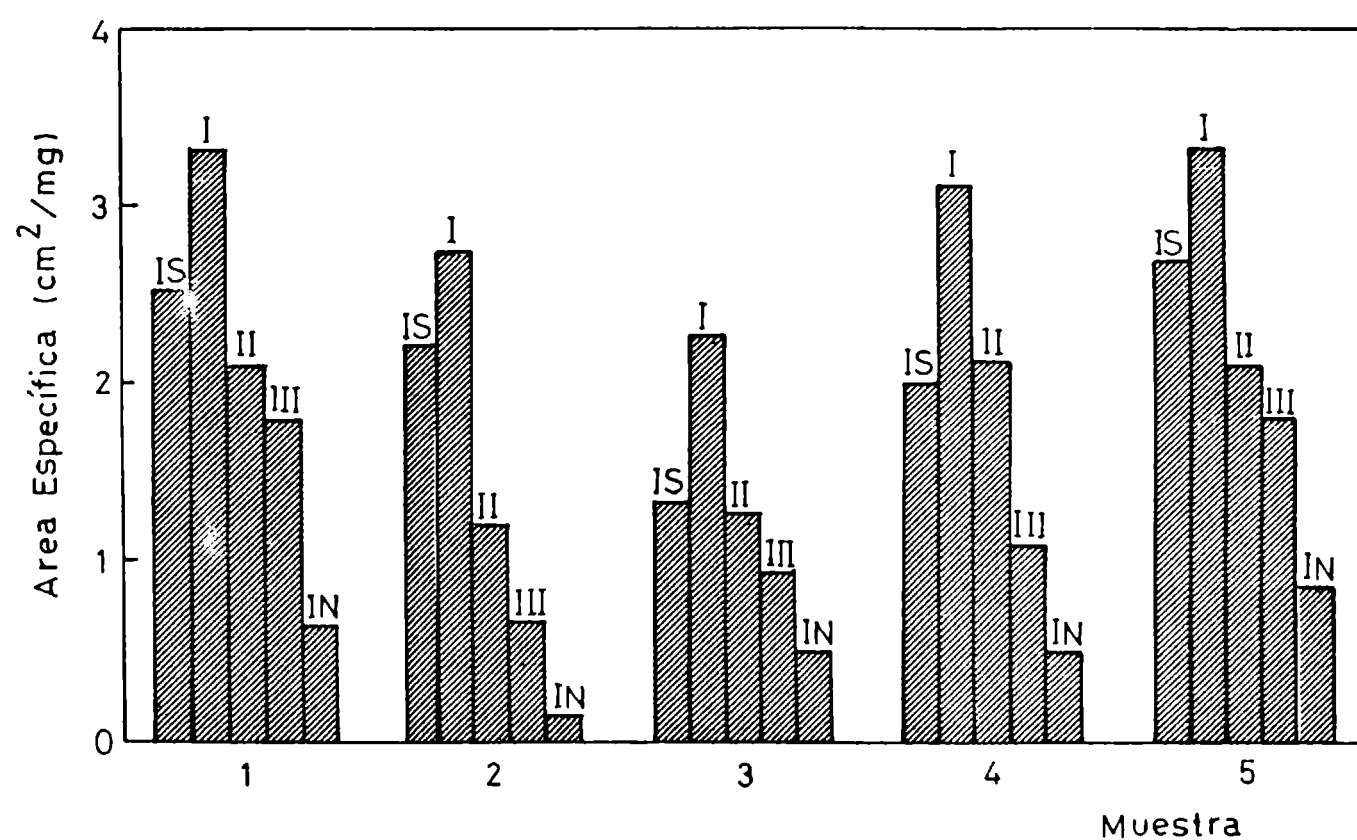


Figura 17: Áreas específicas correspondientes a los termogramas de DSC de los aislados liofilizados y de las diferentes fracciones de cada muestra. IS: aislado; I, II, III: fracciones solubles; IN: fracción insoluble.

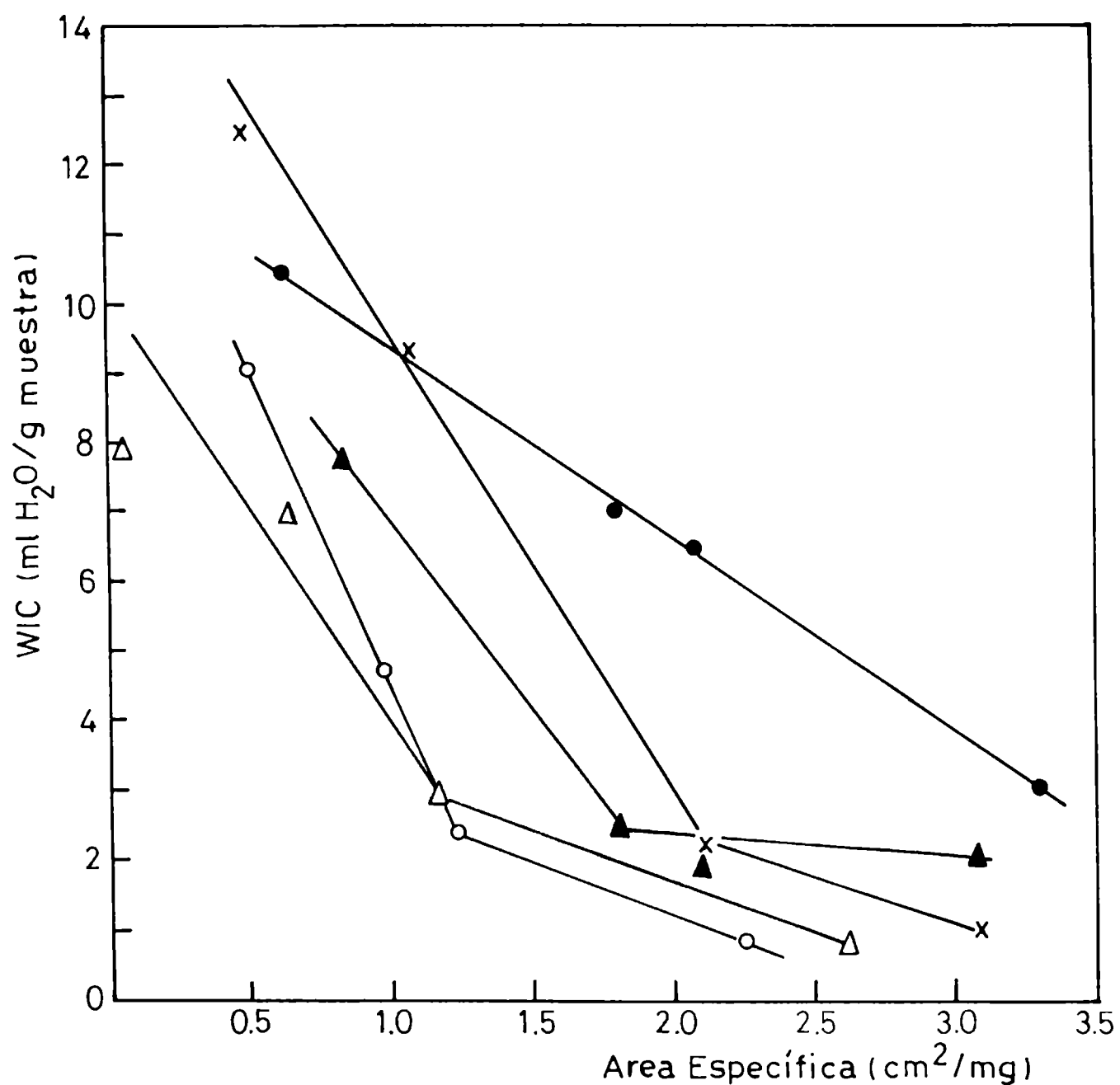


Figura 18: Capacidad de absorción de agua (WIC) de los aislados liofilizados y de las fracciones solubles e insoluble en función de las áreas específicas respectivas.

x muestra 4; o muestra 1; ■ muestra 5; Δ muestra 2; o muestra 3.

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

Tanto las muestras con proteínas nativas como desnaturalizadas presentaron un comportamiento similar (Figura 15). En todos los casos el primer lavado, el cual contiene una mayor proporción de proteínas solubles, mostró la menor WIC y la fracción insoluble la mayor. Este hecho indicaría que la capacidad de absorción de agua de los aislados de soja está influenciada por el estado de agregación de sus proteínas.

Para corroborar esto se evaluó el estado de agregación proteico midiendo la turbidez a 600nm de dispersiones de proteína al 0,3% en agua destilada. En todos los casos analizados (Figura 19) la turbidez aumenta con las sucesivas extracciones lo que indica que el tamaño y/o el número de los agregados se incrementa en el mismo sentido, alcanzando el valor máximo en la fracción insoluble. La comparación de las Figuras 15 y 19 muestra la existencia de una correlación entre la capacidad de absorción de agua y la presencia de agregados; ambos parámetros aumentan a medida que disminuye la solubilidad proteica. Por lo tanto para lograr proteínas con alta capacidad de absorción de agua es importante alcanzar un cierto grado de agregación entre las moléculas, lo que facilita la formación de una red capaz de retener agua.

En base a todo lo discutido se concluye que la WIC de los aislados comerciales de proteínas de soja puede considerarse como la suma de las contribuciones de las proteínas dispersables e insolubles, incidiendo estas últimas en mayor extensión. La misma queda determinada por una relación de compromiso entre la solubilidad de las proteínas y el tipo y grado de agregación. Los aislados con una solubilidad intermedia y una tendencia a formar agregados grandes son los que presentarán mayor WIC.

El estado de desnaturalización de las proteínas incide en la WIC a través de la modificación del estado de agregación; las proteínas desnaturalizadas tienen mayor tendencia a la agregación con lo cual los valores de WIC serán mayores.

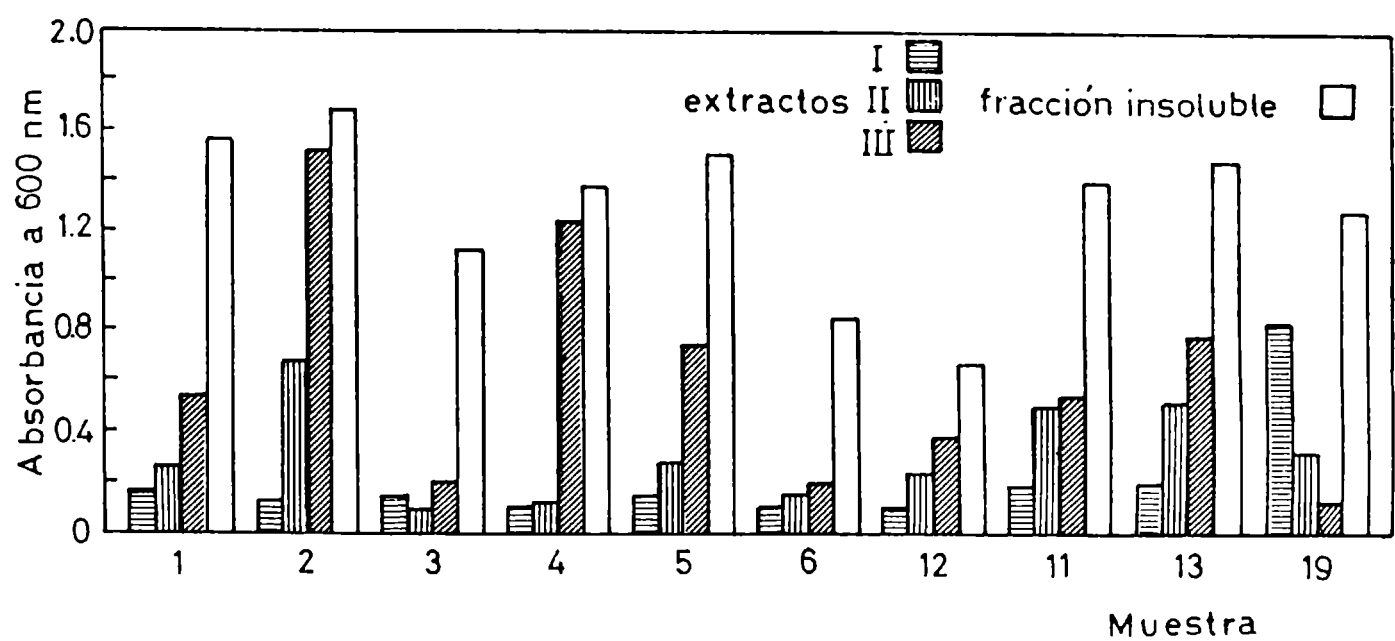


Figura 19: Turbidez de las fracciones solubles e insoluble de cada muestra medida a 600 nm a una concentración de proteína de 3 mg/ml. Los valores fueron obtenidos de los gráficos de turbidez en función de la concentración de proteínas.

#### 3.2.3. Viscosidad

##### 3.2.3.1. Consideraciones generales

La reología de proteínas puede ser vista de un modo simple, como la contribución de dos factores, forma y tamaño de las proteínas en solución, es decir la geometría de las partículas e interacciones interpartículas.

La geometría de las partículas puede variar ya sea por cambios conformacionales, como por efecto de asociación y disociación de las moléculas causada por interacciones intermoleculares. La asociación y disociación además de modificar el volumen hidrodinámico, modifica los grupos que se exponen en la superficie, conduciendo a cambios en la interacción entre partículas (Rha y Pradipasena, 1986).

Tanto el tamaño de las proteínas, vinculado al peso molecular y la hidratación, como la forma, relacionada con la conformación, y los estados de asociación y disociación, definen un empaquetamiento de las partículas el que exhibirá un comportamiento reológico específico.

La viscosidad de una solución de proteínas es dependiente de la concentración. En soluciones diluidas las partículas son cinéticamente independientes, por lo tanto la viscosidad no está afectada por las interacciones interpartícula. Está gobernada por la forma y el tamaño de las moléculas sobre los que influyen directamente el pH, la fuerza iónica y la hidratación. En este caso el comportamiento de la viscosidad se define como Newtoniano. Las características de este tipo de flujo son adecuadamente descriptas por la siguiente ecuación:

$$\eta = \frac{\sigma}{\dot{\gamma}} \quad (10)$$

donde  $\eta$  es la viscosidad (cp),  $\sigma$  es la tensión o esfuerzo de corte definido como el componente de la fuerza tangencial al plano de aplicación de la misma (mPa) y  $\dot{\gamma}$  es la velocidad de deformación, definida como el gradiente

de velocidad establecido en el fluido como resultado del esfuerzo aplicado ( $\text{seg}^{-1}$ ).

En el caso de fluidos Newtonianos la tensión es directamente proporcional a la velocidad de deformación, por lo tanto la viscosidad es independiente de dicha velocidad. En la Figura 20 a y b se representan dos fluidos A y B Newtonianos, siendo A más viscoso que B.

Al aumentar la concentración de la solución, la distancia promedio entre las partículas va disminuyendo alcanzándose un valor de concentración "crítico" por encima del cual la perturbación interpartículas aumenta. Debido a estas interacciones las soluciones de proteínas concentradas exhiben un comportamiento no-Newtoniano, caracterizado por una variación de la viscosidad con la velocidad de deformación. Debido a esto en los fluidos no-Newtonianos se emplea el término "viscosidad aparente o  $\eta_{ap}$ " para referirse a la viscosidad.

A los fluidos no-Newtonianos se los clasifica en varios tipos: plásticos, pseudoplásticos, dilatantes, etc., según sea la forma de la ecuación que vincula  $\eta$  con  $\dot{\gamma}$ . La Figura 20 muestra la variación de la  $\eta_{ap}$  con la  $\dot{\gamma}$  para el caso de dos fluidos con comportamiento plástico. En la misma se puede observar que la  $\eta_{ap}$  varía con velocidad de deformación, lo que explica el empleo del término viscosidad aparente. La Figura 20d muestra además que el fluido A es más o menos viscoso que el B dependiendo del rango de  $\dot{\gamma}$  en el que se realice la medida.

Existe un conjunto de fluidos no-Newtonianos en los que el esfuerzo de corte,  $\sigma$ , es función tanto de la velocidad de deformación,  $\dot{\gamma}$ , como del tiempo en el que se ha aplicado la fuerza. La dependencia con el tiempo presenta al menos cuatro tipos característicos. De ellos el que interesa, en este caso, es el comportamiento tixotrópico, dado que Hermansson (1975) mostró que las dispersiones concentradas de proteínas de soja experimentan

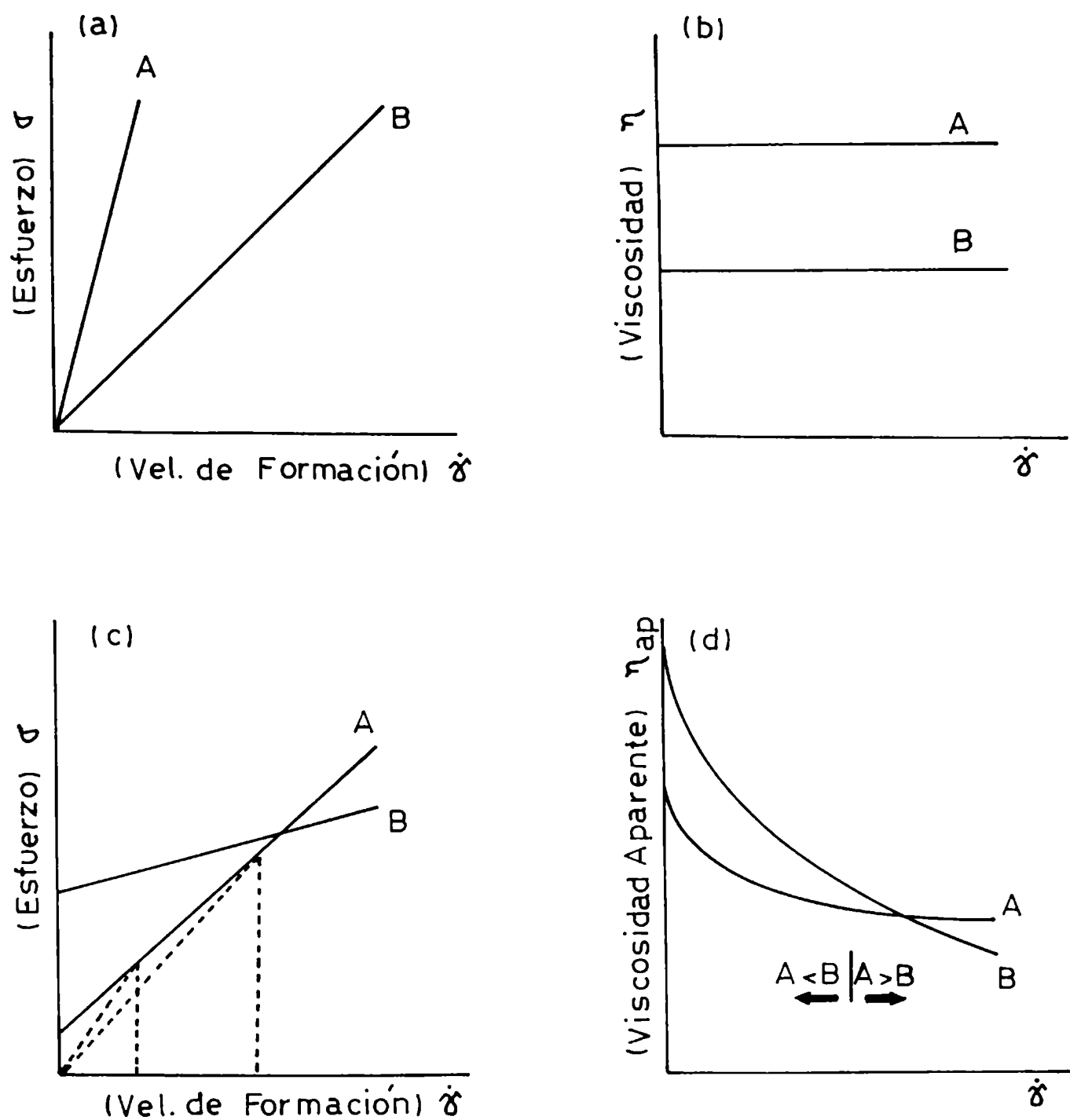


Figura 20: Comportamiento en un fluido Newtoniano: (a) de la relación entre el esfuerzo de corte ( $\sigma$ ) y la velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ); (b) y viscosidad ( $\eta$ ) en función de la  $\dot{\gamma}$ . Idem en un fluido no-Newtoniano (c) y (d).



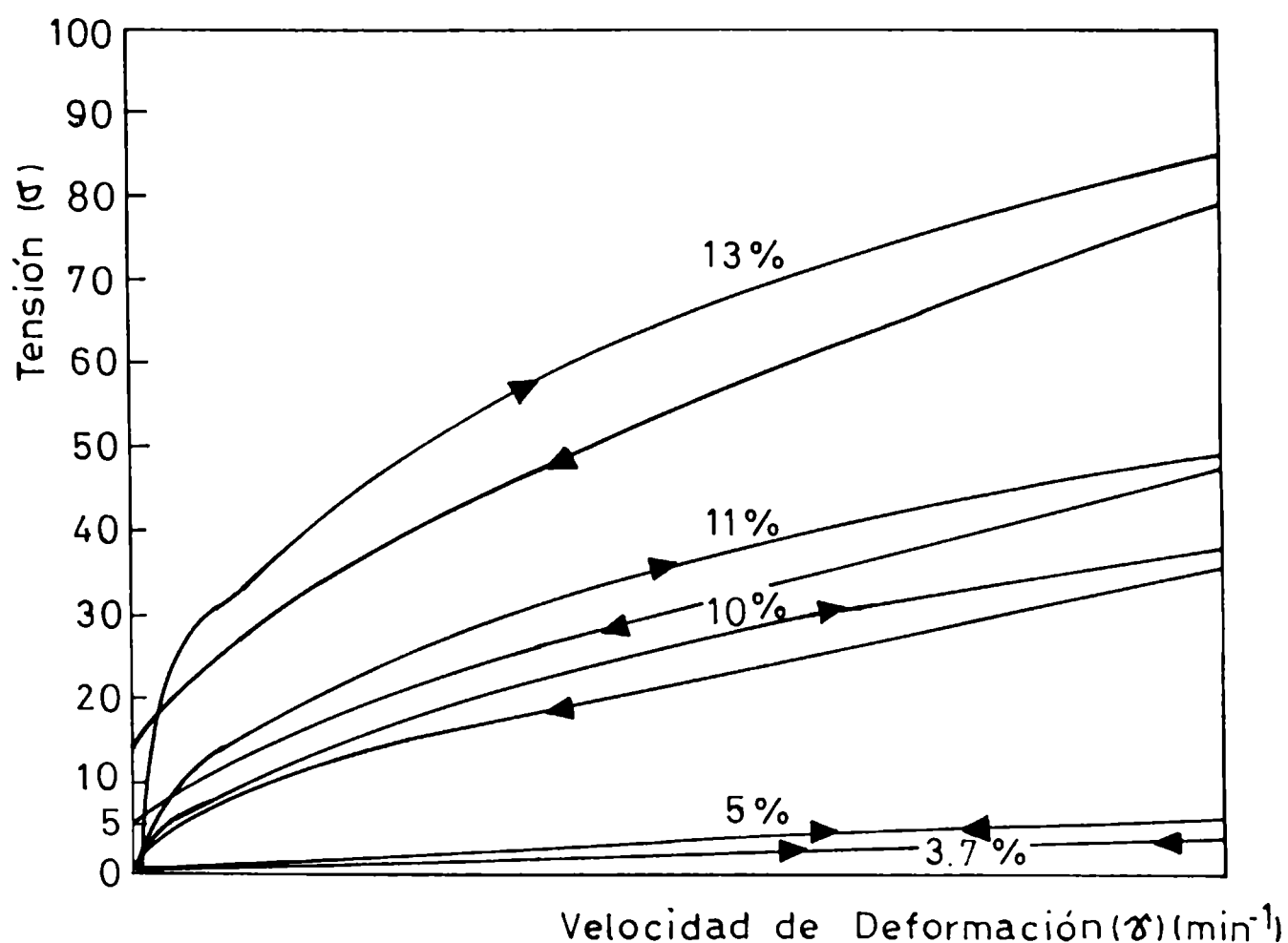
### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

un comportamiento pseudoplástico-tixotrópico. En estos casos la  $\eta_{ap}$  disminuye con el tiempo siendo el cambio reversible. Los fluídos que muestran este comportamiento están constituidos por partículas asimétricas que forman una estructura o red estabilizada por interacciones débiles. Cuando el sistema es sometido a un esfuerzo, esas uniones se irán rompiendo con el tiempo y el fluído irá ofreciendo menor resistencia a fluir; por lo tanto el esfuerzo que se tiene que aplicar para obtener una velocidad de deformación determinada será menor. Esta disminución en el esfuerzo se la interpreta como una disminución en la  $\eta_{ap}$ .

#### 3.2.3.2. Resultado de las determinaciones efectuadas

En la Figura 21 se muestra uno de los registros obtenidos en la determinación de la  $\eta_{ap}$  de los aislados comerciales de soja con el viscosímetro Haake RV2. Las determinaciones se realizaron a una velocidad de deformación entre 0 y 128 rpm durante 2 minutos con un programa que comienza acelerando hasta alcanzar 128 rpm y luego desacelera hasta 0. Las flechas de las curvas indican el sentido del proceso que comienza por la curva superior. El área encerrada entre ambas curvas se llama histéresis.

Se puede observar que a medida que la concentración de proteínas aumenta la diferencia del esfuerzo entre las dos etapas del ciclo es mayor, lo que indica que la diferencia de  $\eta_{ap}$  entre la estructura proteica intacta y la que resulta una vez aplicado el esfuerzo también aumenta, debido al incremento en la rigidez de la estructura proteica al aumentarse la concentración. La aparición de la histéresis está indicando entonces que las partículas se encuentran formando una malla o estructura. Se puede notar que a concentraciones del 5% o inferiores la histéresis desapareció. Esto indica la ausencia de la formación de la malla o estructura en esas condiciones.



**Figura 21:** Registro obtenido con el viscosímetro Haake RV2 de la tensión o esfuerzo de corte ( $\sigma$ ) en función de la velocidad de deformación ( $\dot{\gamma}$ ) correspondiente a dispersiones del aislado 5 en agua destilada al 3,7%, 5%, 10%, 11% y 13% (p/v).  $\dot{\gamma}$  varió entre 0-128-0 rpm.

#### **3.2.3.3. Incidencia de la concentración proteica y el grado de hidratación en la viscosidad aparente**

Los estudios de viscosidad de soluciones diluídas de proteínas, en donde prevalece el comportamiento ideal o Newtoniano por la ausencia de interacciones intermoleculares, brindan información sobre propiedades moleculares. Por ejemplo mediante esta técnica se pueden visualizar modificaciones conformacionales por desnaturalización proteica.

Los alimentos son considerados como suspensiones polidispersas donde las moléculas simples de proteínas se transformaron en partículas visibles. Son además, sistemas complejos en los que coexisten e interactúan distintos componentes lo que determina estados heterogéneos de agregación y/o diversos grados de desnaturalización proteica. En estas condiciones no prevalece un comportamiento ideal en las proteínas y las propiedades moleculares no ejercen una influencia prominente sobre el comportamiento reológico. Por lo tanto, para el estudio de propiedades funcionales en alimentos, resulta de mayor utilidad el comportamiento reológico de suspensiones proteicas a altas concentraciones.

En este caso se estudió el comportamiento de la viscosidad de los aislados comerciales de soja en relación a la concentración proteica, grado de hidratación y de desnaturalización.

La Figura 22 muestra la variación de la  $\eta_{ap}$  con la concentración proteica para algunos de los aislados comerciales de soja analizados. En la misma se puede observar que hasta una concentración de proteínas del 2,5% prevalece el comportamiento ideal, correspondiente a soluciones diluídas, siendo las partículas cinéticamente independientes. A niveles de concentración superior las interacciones interpartícula comienzan a influir, siendo su efecto de gran importancia para valores mayores al 7%.

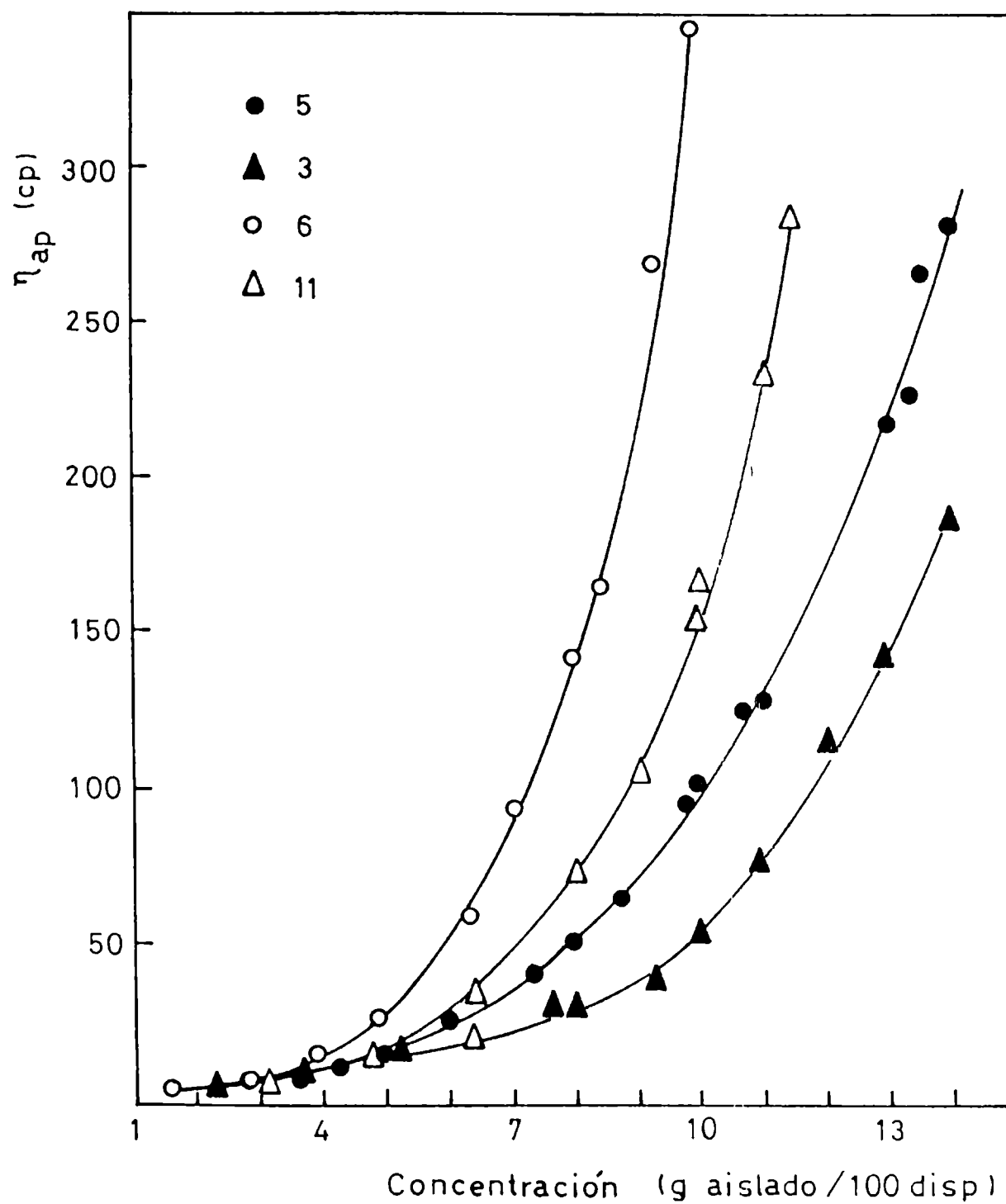


Figura 22: Variación de la viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) en función de la concentración de aislado de soja correspondiente a las muestras 3, 5, 6 y 11.

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

Menjivar y Rha (1980) propusieron un modelo que describe, para un amplio rango de concentración, el comportamiento reológico de proteínas globulares en solución. Este modelo propone la participación en cada macromolécula de un "corazón molecular" y un "volumen interactivo". El corazón molecular es el volumen de la estructura cuaternaria solvatada, en tanto que el volumen interactivo incluye al efecto hidrodinámico y/o potenciales interacciones. Al aumentar la concentración de proteína los volúmenes interactivos entran en contacto y se reducen, transformándose cada partícula en una entidad más compacta la cual al empaquetarse provocará un brusco incremento de la  $\eta_{ap}$ .

Las curvas de viscosidad-concentración obtenidas en nuestro estudio son equivalentes a las observadas por Pradipasena y Rha (1977) y Menjivar y Rha (1980) para  $\beta$ -lactoglobulina y varias proteínas globulares, respectivamente. La viscosidad relativa de una dispersión de partículas esféricas puede ser representada por una expresión virial

$$\eta/\eta_o = 1 + k_1\phi + k_2\phi^2 + \dots \quad (11)$$

donde  $\eta$  = viscosidad del sistema

$\eta_o$  = viscosidad del solvente

$\phi$  = fracción de volumen

$k_1$  y  $k_2$  = coeficientes viriales.

En la Figura 22 se puede observar que aunque todos los aislados proteicos de soja exhiben el mismo tipo de comportamiento algunas muestras alcanzan los valores máximos de  $\eta_{ap}$  a concentraciones del 9% y otras lo hacen a valores del 12-14%. Esto indicaría la incidencia de otros factores en la viscosidad aparente. Se consideró que la diferencia detectada en el comportamiento de los aislados podría estar asociada al grado de hidratación de las partículas. A tal efecto se graficó la  $\eta_{ap}$  de dispersiones de aislados

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

al 10% p/v en agua en función de la WIC (Figura 23). Se puede observar que los aislados proteicos de soja que poseen mayor capacidad de absorción de agua son los que forman dispersiones de mayor viscosidad aparente. Esta relación estaría indicando que la mayor cantidad de agua absorbida por los aislados de mayor WIC o bien genera una mayor cantidad de partículas hidratadas o partículas de más tamaño. Ambas posibilidades implican un aumento en el volumen hidrodinámico.

#### 3.2.3.4. Variación de la viscosidad aparente con la relación T/I

Para comprobar si la diferencia de comportamientos de la  $\eta_{ap}$  de las dispersiones al 10% de los aislados comerciales de soja se debía a diferentes grados de hidratación se calculó la proporción de agua total respecto del agua embebida (T/I) para las distintas dispersiones utilizadas o analizadas.

La Figura 24 muestra que todos los aislados estudiados siguen el mismo comportamiento cuando se grafica la viscosidad aparente en función de la proporción T/I. Para valores de T/I inferiores a 1,5, pequeñas variaciones en la proporción de agua embebida se corresponden con grandes variaciones en la viscosidad aparente. Para valores de agua libres inferiores al 25% del agua total (T/I = 1,33), la fricción interpartícula aumenta mucho provocando un incremento pronunciado de la viscosidad aparente. Por otra parte, para contenidos de agua libre superiores al 75% del agua total (T/I = 4,0), la viscosidad aparente siempre alcanzó su valor mínimo.

La viscosidad aparente en todas las muestras se comportó de la misma manera al variar la proporción de agua embebida (T/I). Consecuentemente, el grado de hidratación de las partículas tiene un efecto preponderante en el comportamiento de la viscosidad aparente. Si se comparan las Figuras 22 y 24 se observa que ese efecto es superior al rol que juega la concentración.

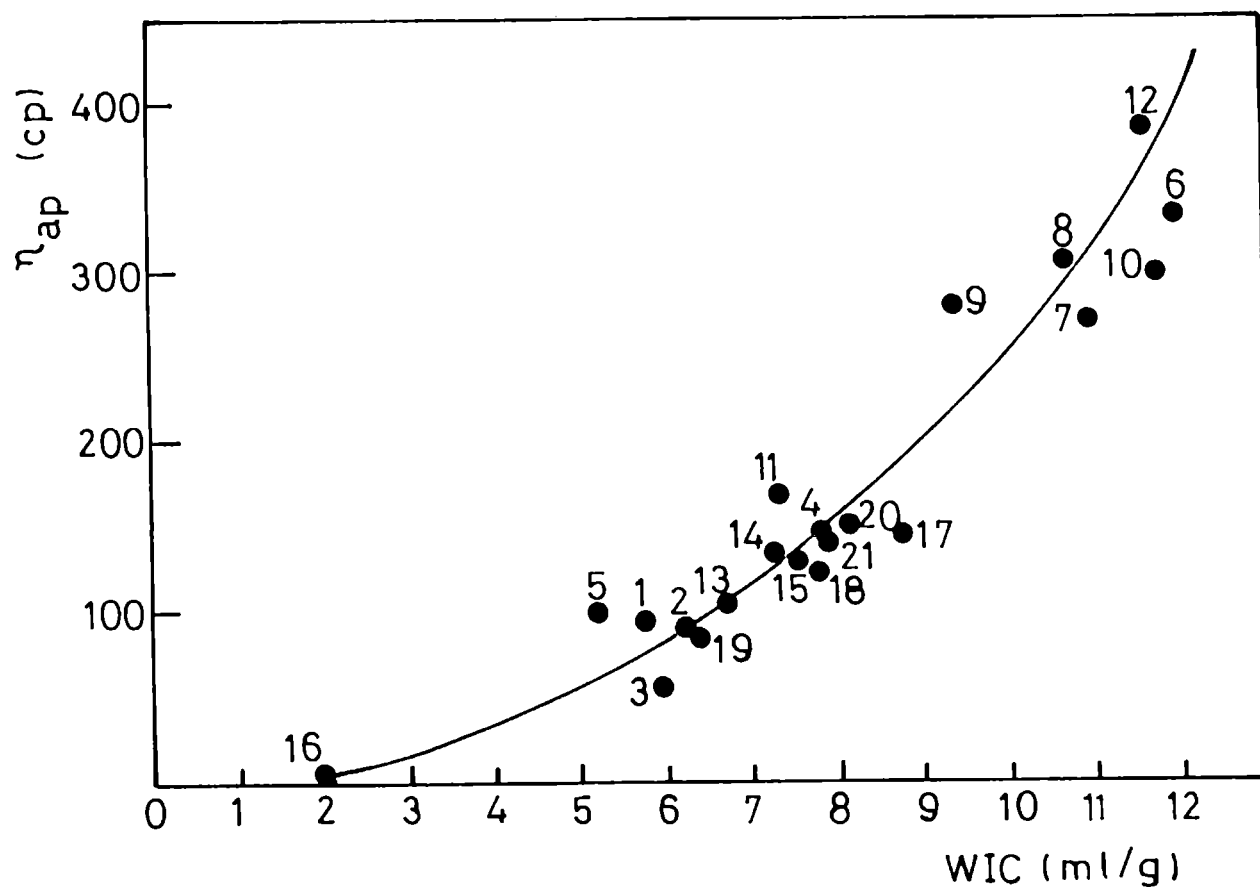


Figura 23: Relación entre la viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) de dispersiones al 10% (p/v) en agua destilada y la capacidad de absorción de agua (WIC) de los aislados de soja analizados. Los números representan las distintas muestras estudiadas.

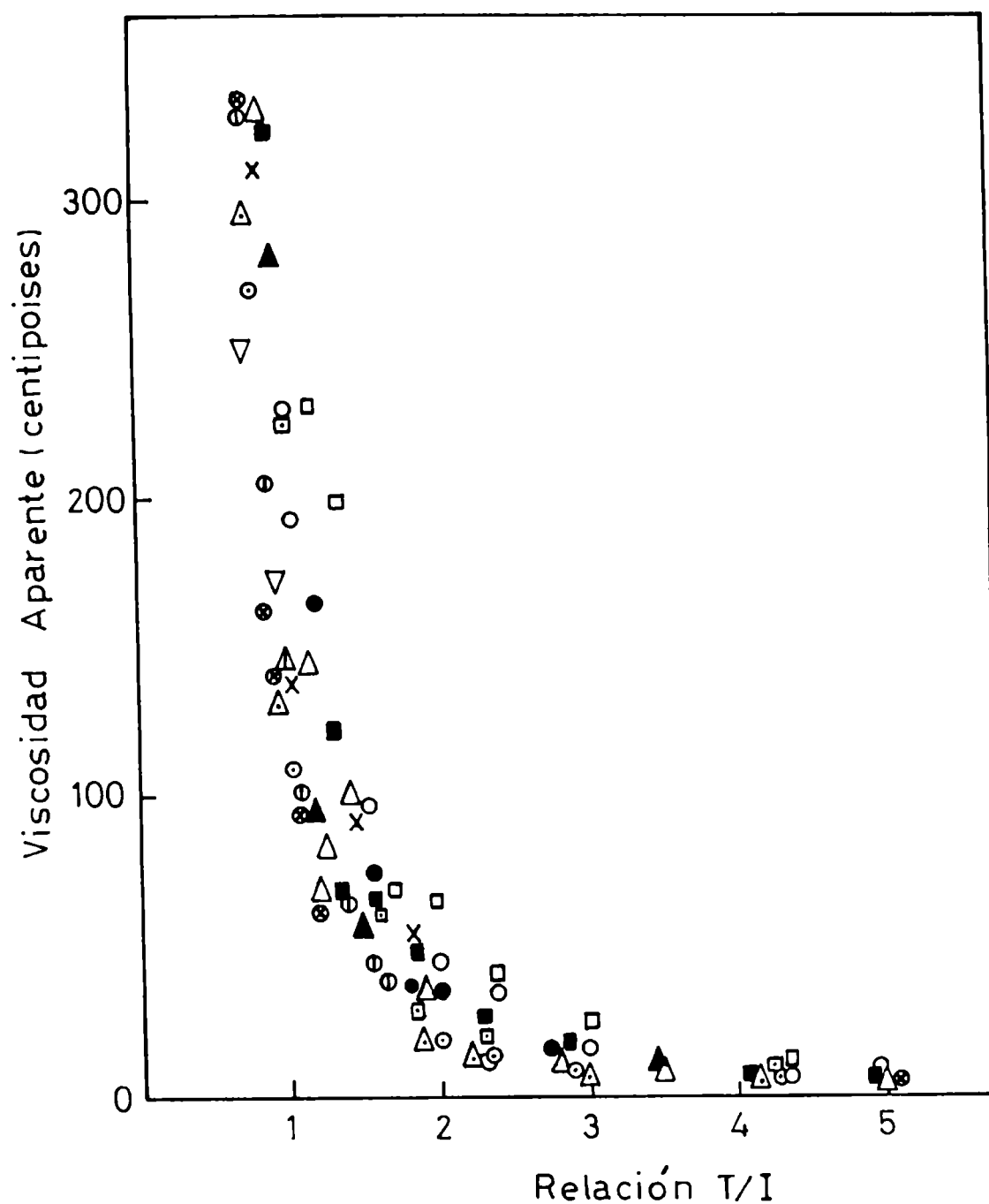


Figura 24: Relación entre la viscosidad aparente ( $\eta_{ap}$ ) y la proporción de agua total respecto del agua embebida (T/I) de los aislados proteicos de soja estudiados.

T: gramos de agua total por gramo de dispersión e I: gramos de agua embebida por gramo de dispersión. Muestras (o), 1; (x), 2; ( $\Delta$ ), 4; ( $\square$ ), 5; ( $\circ$ ), 6; ( $\circ$ ), 7; (+), 8; ( $\Delta$ ), 9; ( $\Delta$ ), 10; ( $\circ$ ), 11; ( $\nabla$ ), 12; ( $\blacksquare$ ), 13; ( $\square$ ), 14; ( $\Delta$ ), 17; ( $\bullet$ ), 19 y ( $\circ$ ), 20.



### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

De acuerdo a resultados obtenidos por Urbanski y col. (1983) el factor que controla las características de flujo de las partículas sólidas es la relación entre el agua embebida y el agua líquida o remanente. Nuestros resultados también muestran que la viscosidad correspondiente a dispersiones de aislados comerciales de proteínas de soja en agua está íntimamente relacionada con la capacidad de absorción de agua. Consecuentemente, las diferencias observadas en la viscosidad aparente de los aislados comerciales provienen de los diferentes tratamientos previos aplicados durante el proceso de obtención, que tuvieron una marcada incidencia en la WIC. Por ende, dispersiones de proteína de viscosidad similar pueden ser obtenidas a partir de dos aislados de diferentes WIC variando la proporción T/I.

#### 3.2.4. Capacidad de gelificación

La viscosidad de los geles inducidos por calentamiento de dispersiones al 10% p/v en agua de los aislados comerciales de proteínas de soja se muestran en la Figura 25. Se observó que en la mayoría de los aislados esta propiedad se relaciona con el contenido de grupos SH libres. En general, las muestras que poseen bajo contenido de SH libres (grupo A, Tabla VI) tienen alta capacidad de gelificación mientras que los aislados con alta proporción de SH libres no gelificaron en las condiciones ensayadas. Esta relación estaría asociada con el rol que juegan los puentes disulfuro en el mantenimiento de la estructura de los geles de proteínas de soja, descrito por distintos autores (Voutsinas y col., 1983; Shiga y Nakamura, 1987; Van Kleef, 1986; Shimada y Cheftel, 1988).

Catsimpoolas y Meyer (1970) propusieron que la gelificación inducida por calor de las proteínas de soja involucra una etapa de agregación reversible, que conduce a la formación de un estado intermedio denominado

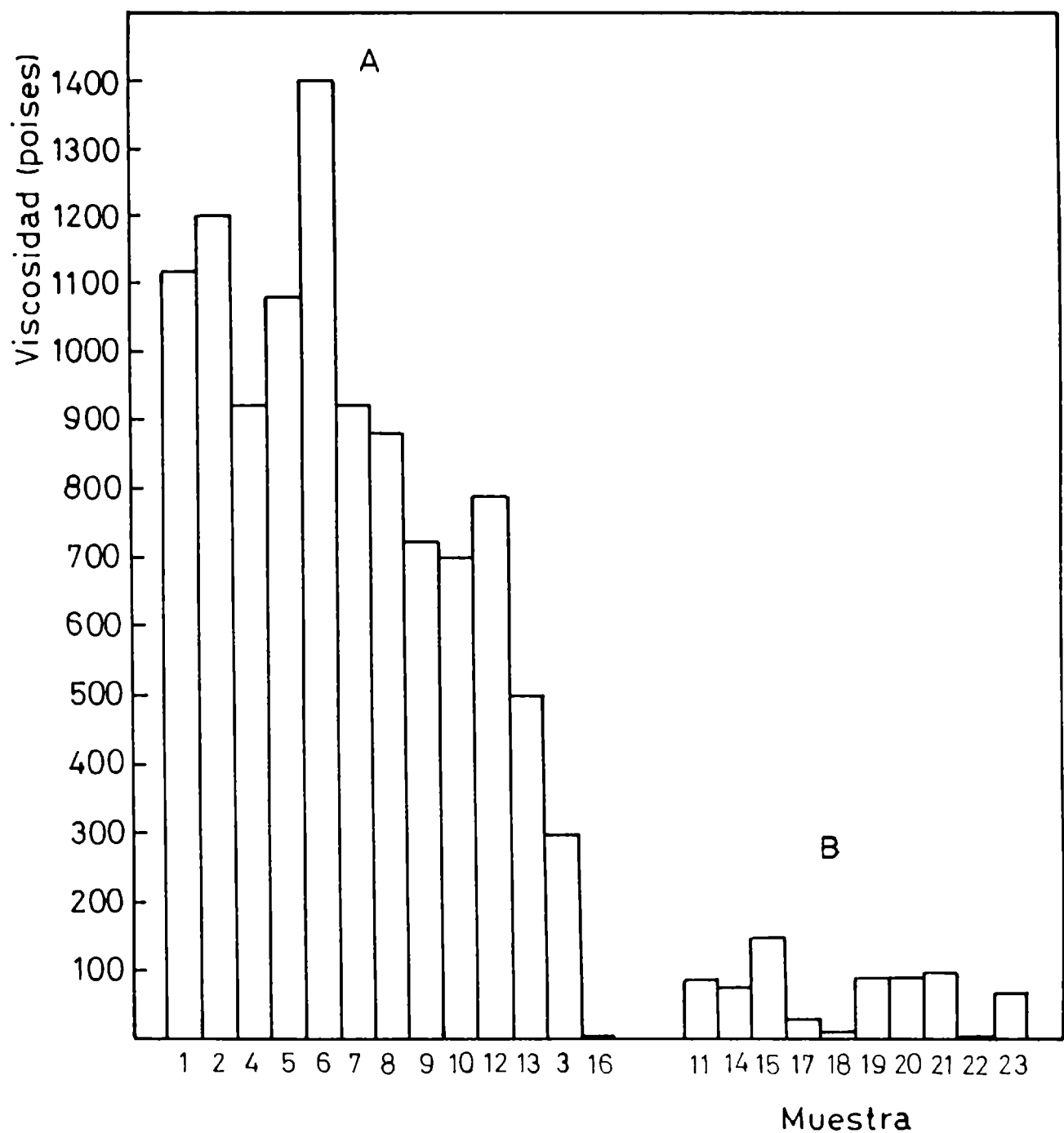


Figura 25: Capacidad de gelificación (viscosidad del gel) de los aislados proteicos de soja. Viscosidad los aislados proteicos de soja estudiados, en dispersiones al 10% (p/p) en agua destilada calentadas a 80°C durante 30 min y enfriadas a 4°C durante la noche. A y B corresponden a los grupos de muestras A y B descriptos en la Tabla VI.

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

progel, donde participan interacciones de tipo no covalente. A medida que el calentamiento continúa el estado de progel presumiblemente se modifica pasando, si las condiciones son apropiadas, a una estructura irreversible llamada gel en la que participan interacciones de tipo no covalente y uniones disulfuro (Schmidt y Morris, 1984). Hermansson (1986a) además señaló que las interacciones entre las moléculas de proteínas es un pre-requisito indispensable para la formación de la estructura del gel y que la orientación de las moléculas en cadenas es importante para el inicio de la gelificación.

Teniendo en cuenta estas observaciones y los resultados por nosotros obtenidos referentes al alto contenido de SH libres de los aislados del grupo B (Tabla VI) a la ausencia de subunidades intermedias AB (Figura 8) y la existencia de agregados  $\beta$ -B insolubles en agua (Tabla V y Figura 6), consideramos que la disminución de la capacidad de gelificación observada en este grupo de aislados se debe a:

- una disminución de la capacidad de formación de uniones disulfuro a través de reacciones de intercambio SH/SS u oxidación de grupos sulfhidrilos libres durante la gelificación debido a la reducción parcial o total y posterior reoxidación de los puentes -S-S- nativos durante el proceso de obtención de estos aislados.
- una reducción en las posibilidades de interacción adecuada entre las proteínas, lo que permitiría a las moléculas orientarse en cadenas para iniciar la gelificación debido a la existencia en los aislados de agregados, insolubles en agua, que involucran las subunidades  $\beta$ -7S y los polipéptidos básicos de la proteína 11S.

Las muestras correspondientes al grupo A mostraron alta capacidad de gelificación, con excepción de los aislados 3 y 16 (Figura 25). Estos aislados poseen un bajo contenido de grupos sulfhidrilos libres (al igual que el resto de las muestras del grupo A) pero un alto contenido en calcio

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

(Tabla II). Este ion, por ser divalente, puede interactuar con dos grupos negativos pertenecientes a moléculas distintas ejerciendo así un efecto de puente que facilita la agregación (Hermansson, 1986b). El comportamiento de los aislados 3 y 16, puede entonces atribuirse a las alteraciones provocadas por el calcio en la capacidad de interacción de las proteínas y por ende en la formación de la estructura del gel. Cabe señalar que cuando una dispersión en agua del aislado 16 se somete a calentamiento se observa la formación de grumos. Estos grumos no serían más que agregados proteicos en los que participan fuertes interacciones locales mediadas por calcio, lo que imposibilita la formación de posteriores estructuras, tal como la involucrada en un gel.

#### 3.2.5. Capacidad de emulsificación

Los valores obtenidos de la capacidad de emulsificación (EC) de los aislados comerciales de proteínas de soja se muestran en la Tabla XII. La formación de una emulsión en base a proteínas, considerando condiciones ideales, involucra la difusión de la proteína soluble hacia la interfase agua-aceite donde se concentra y tiende a desplegarse orientando los residuos hidrofóbicos hacia la fase no polar y los residuos polares hacia la fase acuosa. Esto conlleva a la formación de un film interfacial, el cual se produce en etapas secuenciales dependiendo de la flexibilidad molecular, carga e hidrofobicidad de las proteínas (Kinsella, 1982). La solubilidad es un pre-requisito importante para la formación del film. Nuestros resultados muestran (Figura 26) que aquellos aislados comerciales con solubilidades en agua inferiores al 17,5% (muestras 11, 18, 17, 19, 21 y 16) poseen la mínima capacidad de emulsificación. Las muestras con alta solubilidad en agua no presentan un comportamiento uniforme. Por ejemplo, el aislado 13 es más

**3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL**

**TABLA XII:** Capacidad de emulsificación (EC) y solubilidad en agua de los aislados comerciales de proteínas de soja

Aislado	EC	Solubilidad (%)
1	391	58,8
2	361	47,0
3	293	25,4
4	353	33,3
5	403	60,8
6	410	31,0
7	408	27,3
8	376	25,5
9	356	23,9
10	351	25,7
11	230	17,2
12	450	56,3
13	467	82,7
14	391	33,8
15	367	21,2
16	220	6,9
17	231	11,2
18	231	12,9
19	223	10,7
20	308	17,9
21	270	17,3
22	360	75,1
23	285	29,9

La EC se expresó en g de aceite/g de aislado. La solubilidad fue determinada el 1.6.90. Estos resultados se graficaron en la Figura 26.

LSD<sub>0,05</sub>: 26,9.

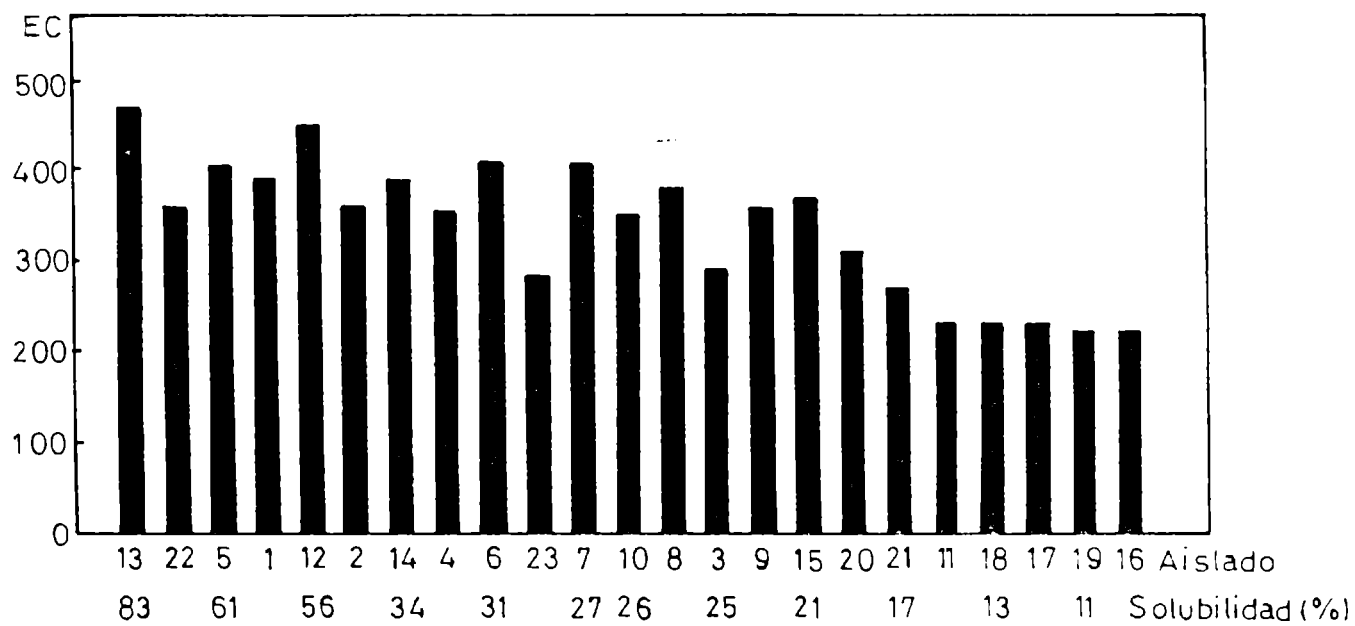


Figura 26: Capacidad de emulsificación (EC) de los aislados proteicos de soja ordenada por solubilidad decreciente. La EC se expresó en gramos de aceite/gramo de aislado.

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

soluble que el 22 y su EC es mayor, en tanto que el aislado 5 posee una solubilidad inferior a la correspondiente al 22 siendo su EC más alta. Estos resultados indican que la solubilidad *per se* no permite predecir la capacidad de emulsificación de las proteínas de soja. De acuerdo a Aoki y col. (1980) la capacidad emulsificante de aislados de proteínas de soja preparados en el laboratorio correlaciona con su solubilidad en agua, no así la correspondiente a las proteínas 7S y 11S.

Li-Chan y col. (1984) también observaron que la EC de proteínas de carne tratadas térmicamente es fuertemente afectada por la solubilidad, especialmente cuando la solubilidad es reducida.

Dado que la formación de la emulsión requiere, tal como se mencionó anteriormente, el desplegamiento de la proteína en la interfase agua-aceite, podría pensarse que el grado de desnaturalización proteica puede afectar su EC. Analizando en este sentido los resultados obtenidos se observó que los aislados con mayor proporción de proteínas nativas tienen una capacidad emulsificante semejante a aquéllos con proteínas totalmente desnaturalizadas. Esto nos indicaría que la desnaturalización de las proteínas no logra aumentar la EC; sin embargo, es necesario tener en cuenta que la desnaturalización favorece la agregación, por lo tanto las proteínas desnaturalizadas pueden no estar desplegadas sino formando parte de agregados. Si se comparan los aislados con solubilidad en agua semejante (presumiblemente con estados de agregación equivalentes) y distinto grado de desnaturalización proteica, se observa que aquéllos con proteínas totalmente desnaturalizadas ( $\Delta H = 0$ ) exhiben la mayor EC (Figura 27). Estos aislados a su vez son los que presentan los máximos valores de hidrofobicidad superficial. En la Figura 28 se puede observar que la capacidad de emulsificación de los aislados estudiados varía en forma lineal con la hidrofobicidad superficial de los mismos. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por Kato

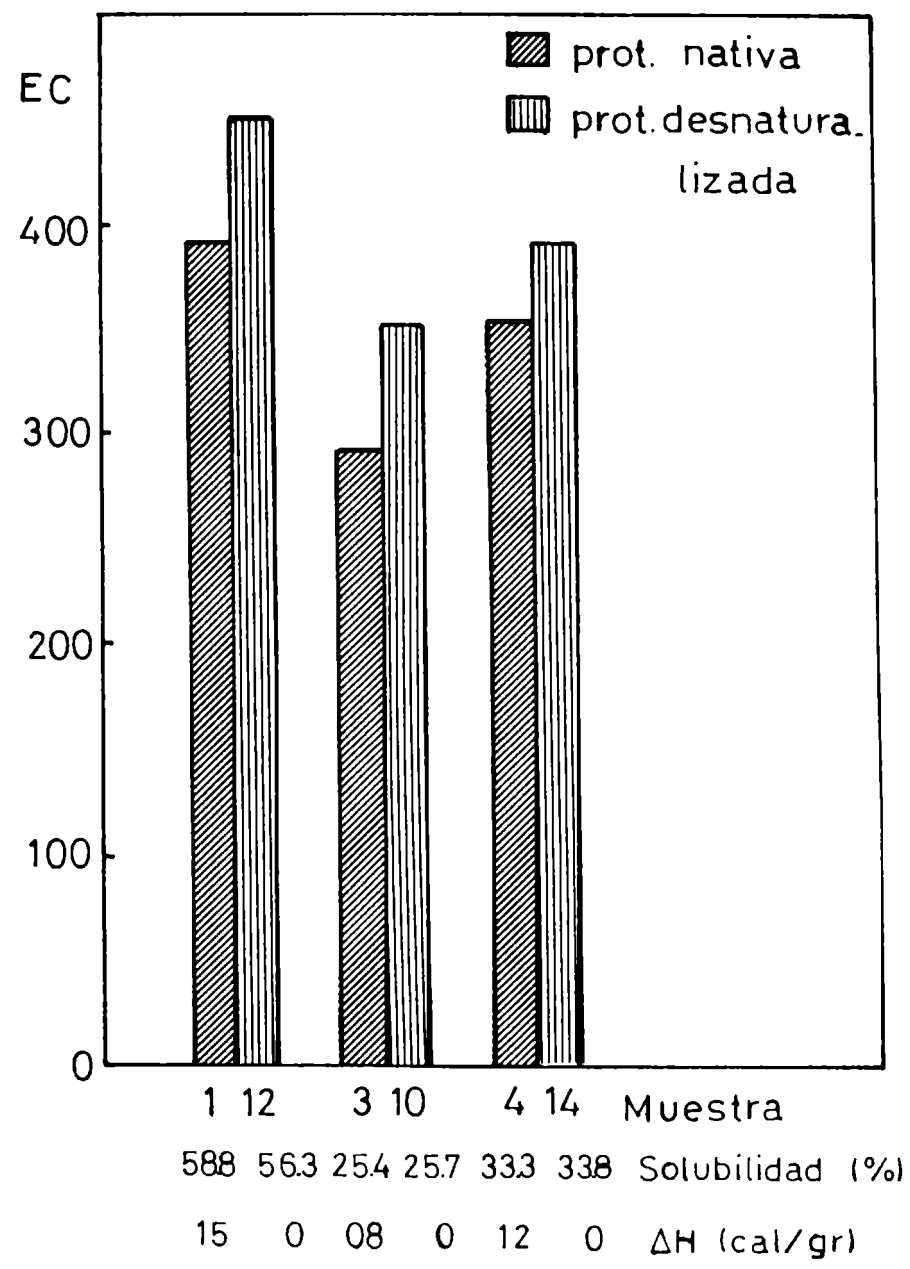
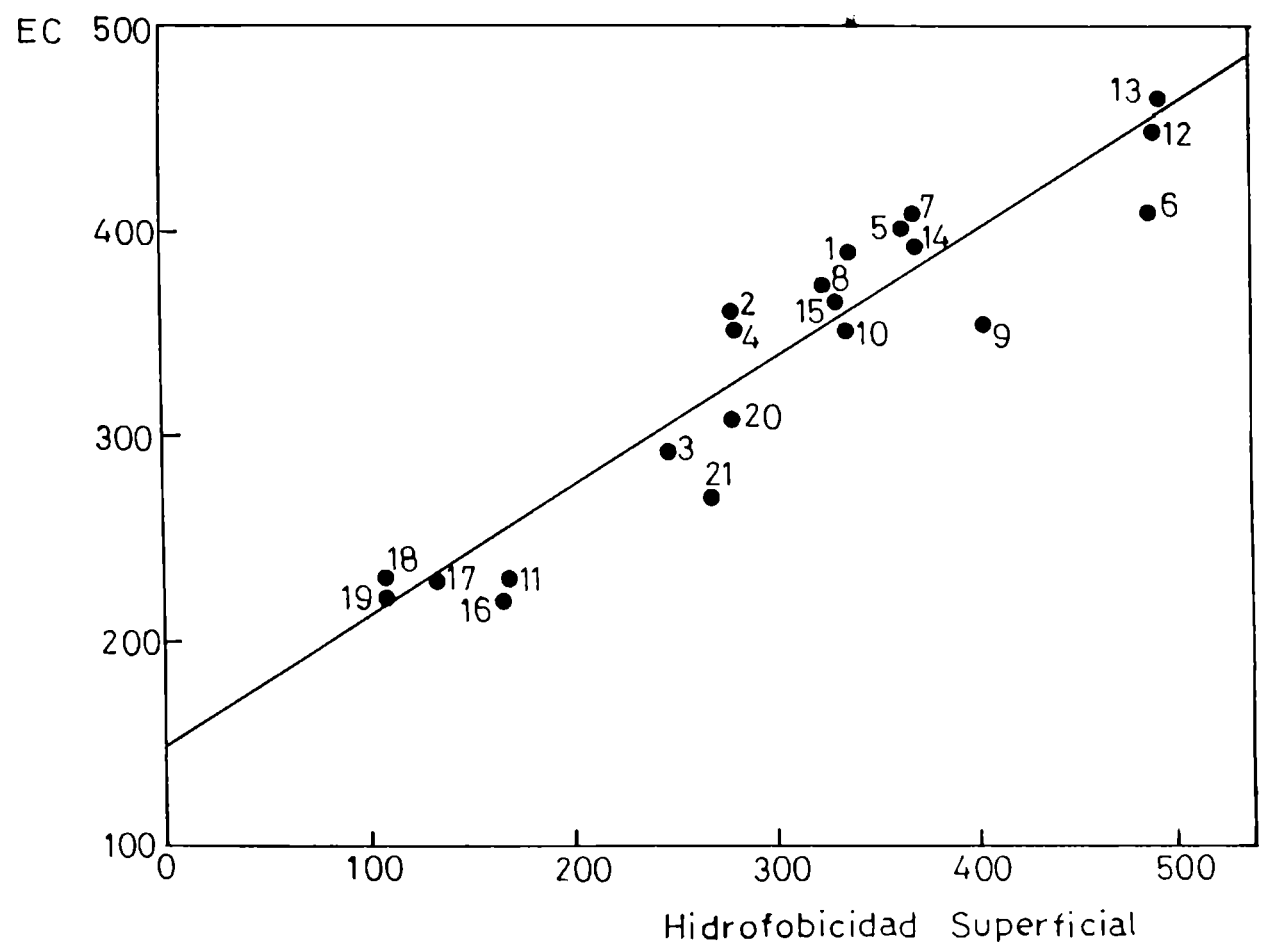


Figura 27: Comparación de la capacidad de emulsificación (EC) entre aislados con proteínas nativas o desnaturalizadas y similar solubilidad. La EC se expresó en gramos de aceite/gramos de aislado.





**Figura 28:** Capacidad de emulsificación (EC) en función de la hidrofobicidad superficial ( $S_0$ ) de los aislados comerciales de proteínas de soja estudiados.

La EC se expresó en gramos de aceite/gramo de aislado.

### 3. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA DE ORIGEN COMERCIAL

y Nakai (1980) quienes mostraron la importancia de la  $S_0$  en la estabilización de las interacciones lípido-proteína y aquéllos de Voutsinas y col. (1983) que demostraron la incidencia de la  $S_0$  en la capacidad de formación de la emulsión y de la solubilidad en la estabilidad de la misma.

**AISLADOS    PROTEICOS  
DE SOJA OBTENIDOS  
EN EL LABORATORIO**

## **4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO**

### **4.1. MODIFICACION DE PROPIEDADES DE AISLADOS PROTEICOS DE SOJA POR TRATAMIENTO TERMICO Y AGREGADO DE CALCIO**

#### **4.1.1. Optimización del procedimiento básico de extracción**

De acuerdo a los resultados discutidos previamente, referentes a las características fisicoquímicas y funcionales de los aislados comerciales de proteínas de soja, surge claramente que el agregado de calcio y la desnaturalización proteica constituyen dos herramientas importantes las cuales permiten modificar las propiedades de este tipo de productos. No obstante el análisis llevado a cabo, no es posible determinar en forma específica la incidencia de cada una de estas herramientas puesto que el proceso utilizado en la industria para obtener aislados proteicos consta de diversas etapas, donde se hace uso de agregados de ácido y álcali, tratamientos térmicos, adición de sales, etc. Estos tratamientos en forma individual y/o combinada provocan cambios en la temperatura, fuerza iónica, pH, composición, etc. del medio que rodea a las proteínas y pueden afectar su conformación nativa y por ende las propiedades funcionales que exhibe.

A efectos de profundizar los conocimientos existentes relativos a la acción de la temperatura y presencia de iones sobre la funcionalidad de las proteínas de soja y corroborar las conclusiones elaboradas a partir de los estudios realizados con los productos de origen comercial, se analizó el comportamiento y propiedades de aislados de soja obtenidos en el laboratorio bajo condiciones conocidas y controladas.

Para comenzar este estudio se ensayaron, en primer lugar, distintas alternativas del procedimiento básico de obtención de aislados proteicos de soja con el objeto de disponer de un método acorde a nuestras necesidades. Se deseaba un método que proporcionara proteínas de buena calidad las cuales exhibieran el menor grado de desnaturalización posible.

#### 4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO

En primer término se evaluó la incidencia de la relación de extracción harina:agua empleada. Se probaron dos relaciones 1:10 y 1:20 expresadas como masa (g) de harina desgrasada de soja por volumen (ml) de agua alcalina empleada. Los rendimientos obtenidos en la etapa de extracción fueron 37 y 54% para las relaciones 1:10 y 1:20, (p/v) respectivamente; en tanto que luego de la precipitación isoelectrica se obtuvieron porcentajes del 83 y 78% para las mismas relaciones harina:agua. Cabe señalar que en ambos casos se mantuvo constante el tiempo y temperatura de extracción, al igual que las condiciones de agitación y pH. Los resultados mostrados indican que el aumento de la relación harina:agua favorece principalmente la solubilización de las proteínas.

Si en lugar de realizar una sola extracción con una relación harina:agua de 1:20 (p/v) se llevan a cabo dos extracciones sucesivas empleando, en cada caso, diez partes de agua por cada parte de harina (1:10, p:v) el rendimiento total del proceso se incrementa aún más, alcanzando valores del 56%. Obviamente la eficiencia del proceso mejora pues no sólo se incrementa la relación volumen de extractante:cantidad de materia prima, sino que se duplica el tiempo de extracción.

Otra variable analizada fue la temperatura a la cual se lleva a cabo la extracción de las proteínas. Habitualmente ésta se realizaba a temperatura ambiente, por lo tanto se pensó utilizar una temperatura más elevada pero que no alterara la conformación de las proteínas, por lo que se eligió 50°C. En este caso se mantuvieron el resto de las condiciones de extracción, con excepción de la agitación la cual fue mecánica. Tal como se señalara en Materiales y Métodos, sección 2.1.2.2.d), la extracción se llevó a cabo en baño de agua termostatzado con agitación. El rendimiento total obtenido fue 32% a 20°C y 42% a 50°C. Estos resultados muestran que el incremento de temperatura tiene escasa influencia en la solubilización de las proteínas de soja. Debe, sin embargo, tenerse en cuenta que la agitación

#### 4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO

magnética es más eficiente que la mecánica; el uso de esta última determinó una disminución del rendimiento total de extracción del orden del 7%.

Finalmente se analizó el efecto del pH. En este caso las condiciones de extracción empleadas fueron: relación harina:agua 1:20 (p:v); temperatura 20°C; agitación magnética; pH 7-8 y 9. Los valores de rendimiento determinados a esos pHs fueron 42-39 y 51%, respectivamente. Estos resultados muestran un incremento del rendimiento total del orden del 10% al pH más alcalino.

Dado que nuestro objetivo era obtener la mayor cantidad posible de proteína nativa y a efectos de seleccionar las mejores condiciones de extracción, evaluamos no sólo el rendimiento de cada extracción sino también la solubilidad en agua de las proteínas extraídas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XIII. Puede observarse que la solubilidad varió entre 82% y 88,6%. Estos valores indican que las condiciones empleadas en las distintas extracciones efectuadas no producen alteraciones importantes en el estado de agregación de las proteínas. Acorde a esto y a los rendimientos alcanzados se seleccionaron como condiciones definitivas de extracción las siguientes:

relación harina:agua - 1:20 (p/v)

temperatura - 20°C

pH - 8

tipo de agitación - magnética

En cuanto al pH debe mencionarse que se seleccionó pH 8 por haberse obtenido mayor solubilidad (aunque las diferencias son muy pequeñas) y ser éste el pH al que se llevan finalmente los aislados proteicos obtenidos.

4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO

TABLA XIII: Solubilidad en agua de los aislados obtenidos bajo distintas condiciones de extracción

Condición de extracción	Solubilidad (%)
<u>Relación agua:harina (p/v)</u>	
1:10	85,0
1:20	87,5
<u>Temperatura (°C)</u>	
50	87,4
20	88,6
<u>pH</u>	
7	82,0
8	88,0
9	82,8

### 4.1.2. Efecto del tratamiento térmico

Seleccionadas las condiciones de obtención, a nivel de laboratorio, de los aislados de proteínas de soja, procedimos a estudiar el efecto de diferentes tratamientos térmicos sobre las características y propiedades de sus proteínas. Una vez aplicados los tratamientos detallados en Materiales y Métodos, Sección 2.1.2.3.a), se determinó el grado de desnaturalización proteica alcanzado en cada caso y las siguientes propiedades fisicoquímicas y funcionales: hidrofobicidad superficial ( $S_o$ ), composición proteica de las fracciones solubles en agua, contenido de grupos sulfhidrilos libres, solubilidad y capacidad de absorción de agua.

#### 4.1.2.1. Grado de desnaturalización proteica

El grado de desnaturalización proteica alcanzado en cada caso se evaluó mediante calorimetría diferencial de barrido. La Figura 29 muestra algunos de los termogramas obtenidos. En la misma se puede observar que a medida que el tratamiento térmico es más intenso el área total del termograma disminuye hasta hacerse nula luego de un tratamiento a 100°C durante 30 min. Es posible asimismo observar que la proteína  $\beta$ -conglucina o 7S (primera endoterma) es más sensible al calentamiento, hecho que se hace evidente en la magnitud de la disminución del área que experimenta la primer transición endotérmica respecto de la segunda, la cual corresponde a la proteína glicina u 11S. Este hecho podría estar determinado por las diferentes estructuras que presentan estas proteínas. Ambas son oligoméricas, pero en  $\beta$ -conglucina las subunidades que la componen interactúan a través de uniones de tipo no-covalente, mientras que en la estructura de la glicina participan uniones disulfuro intra o inter cadenas de los polipéptidos A y B (Introducción, Sección 1.4.2.). Estas uniones probablemente sean las



#### 4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO

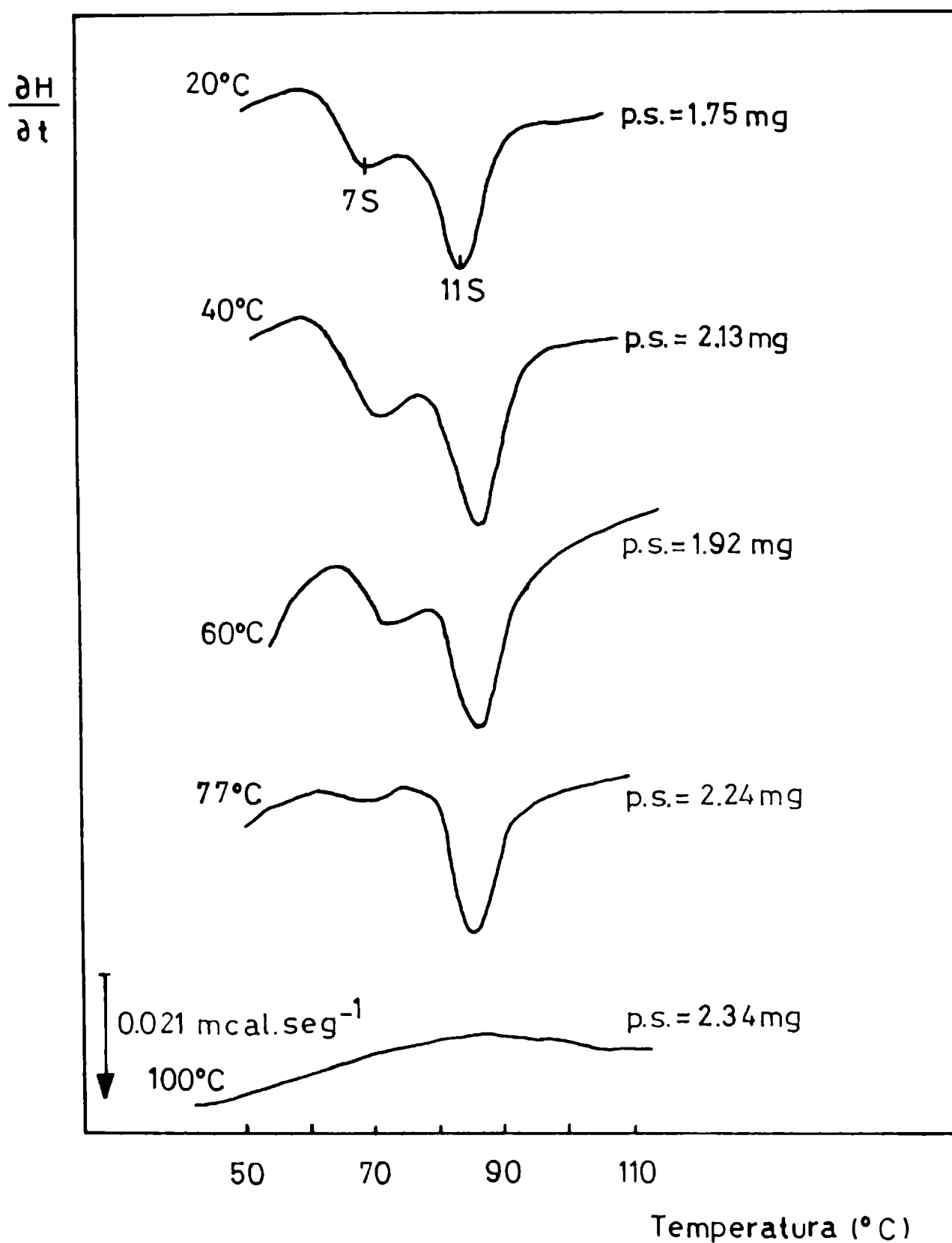


Figura 29: Termogramas DSC de aislados proteicos de soja obtenidos en el laboratorio sometidos a diferentes tratamientos térmicos. Velocidad de calentamiento: 10°C min<sup>-1</sup>. Sensibilidad: 0,021 mcal seg<sup>-1</sup>. 7S: proteína  $\beta$ -conglucina; 11S: proteína glicina; p.s.: peso seco.

#### 4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO

que determinen la compacticidad de la proteína IIS y su mayor estabilidad al calor.

En base a las medidas de área realizadas, correspondientes a cada termograma, se calcularon los valores entálpicos ( $\Delta H$ ) y la disminución del contenido de proteína nativa luego de cada tratamiento térmico. En este último caso los resultados se expresaron de manera porcentual considerando 100% el valor de entalpía del aislado mantenido 30 min a 20°C. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XIV. Se puede observar que un tratamiento a 40°C durante 30 min no altera las proteínas de soja, lográndose la desnaturalización total de las mismas luego de un calentamiento a 100°C durante 30 min o a 90°C y el doble de tiempo. El 50% de las proteínas siguen siendo nativas luego de 30 min a 77°C.

##### 4.1.2.2. Hidrofobicidad superficial

En la Figura 30a se muestra la variación de la hidrofobicidad superficial,  $S_o$ , de soluciones al 5% de aislados proteicos de soja en agua tratados durante 30 min a distintas temperaturas. Como puede observarse la  $S_o$  se incrementa a medida que aumenta la temperatura, lo cual es esperable dado que el tratamiento térmico provoca el desplegamiento de las cadenas polipeptídicas y la exposición de los grupos hidrofóbicos. El incremento mayor de la  $S_o$  se produce en el rango comprendido entre 60 y 77°C, rango en el cual el grado de desnaturalización proteica aumenta de un 13 a un 51% (Tabla XIV).

A efectos de determinar si la prolongación del tratamiento térmico, una vez alcanzado el desplegamiento total de las moléculas de proteínas ( $\Delta H = 0$ ), provocaba modificaciones en la hidrofobicidad superficial de las mismas, se llevaron a cabo tratamientos térmicos a 90°C durante 20 a 360 min. Los resultados obtenidos (Figura 30b) muestran que la  $S_o$  aumenta a

**4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO**

**TABLA XIV:** Contenido de proteína nativa en los diferentes aislados sometidos a distintos tratamientos térmicos

Aislado	Tratamiento térmico	Proteína nativa (%)
1	20°C - 30 min	100
2	40°C - 30 min	100
3	60°C - 30 min	87
6	50°C - 60 min	69
4	77°C - 30 min	49
7	70°C - 60 min	24
8	90°C - 60 min	0
5	100°C - 30 min	0

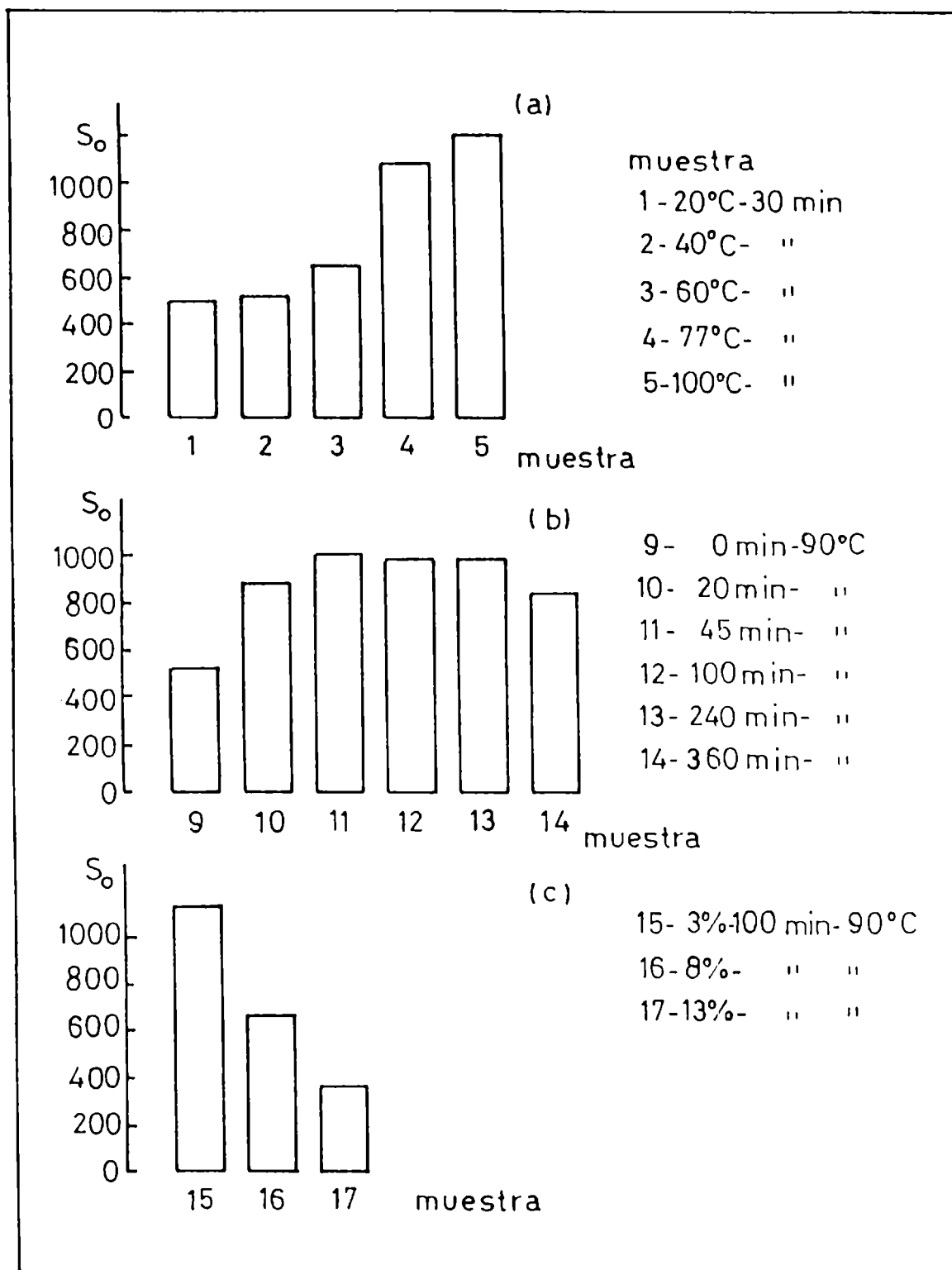


Figura 30: Hidrofobicidad superficial ( $S_0$ ) de aislados proteicos de soja obtenidos en el laboratorio sometidos a diferentes tratamientos. (a) Igual tiempo a distintas temperaturas (concentración de proteína 5% p/v); (b) Igual temperatura a distintos tiempos (concentración de proteína 5% p/v); (c) Igual tratamiento térmico a distintas concentraciones proteicas.

#### 4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO

medida que disminuye el  $\Delta H$ , el cual alcanza el valor cero transcurridos 45 min de tratamiento, luego se mantiene y comienza a disminuir después de un calentamiento muy prolongado (360 min).

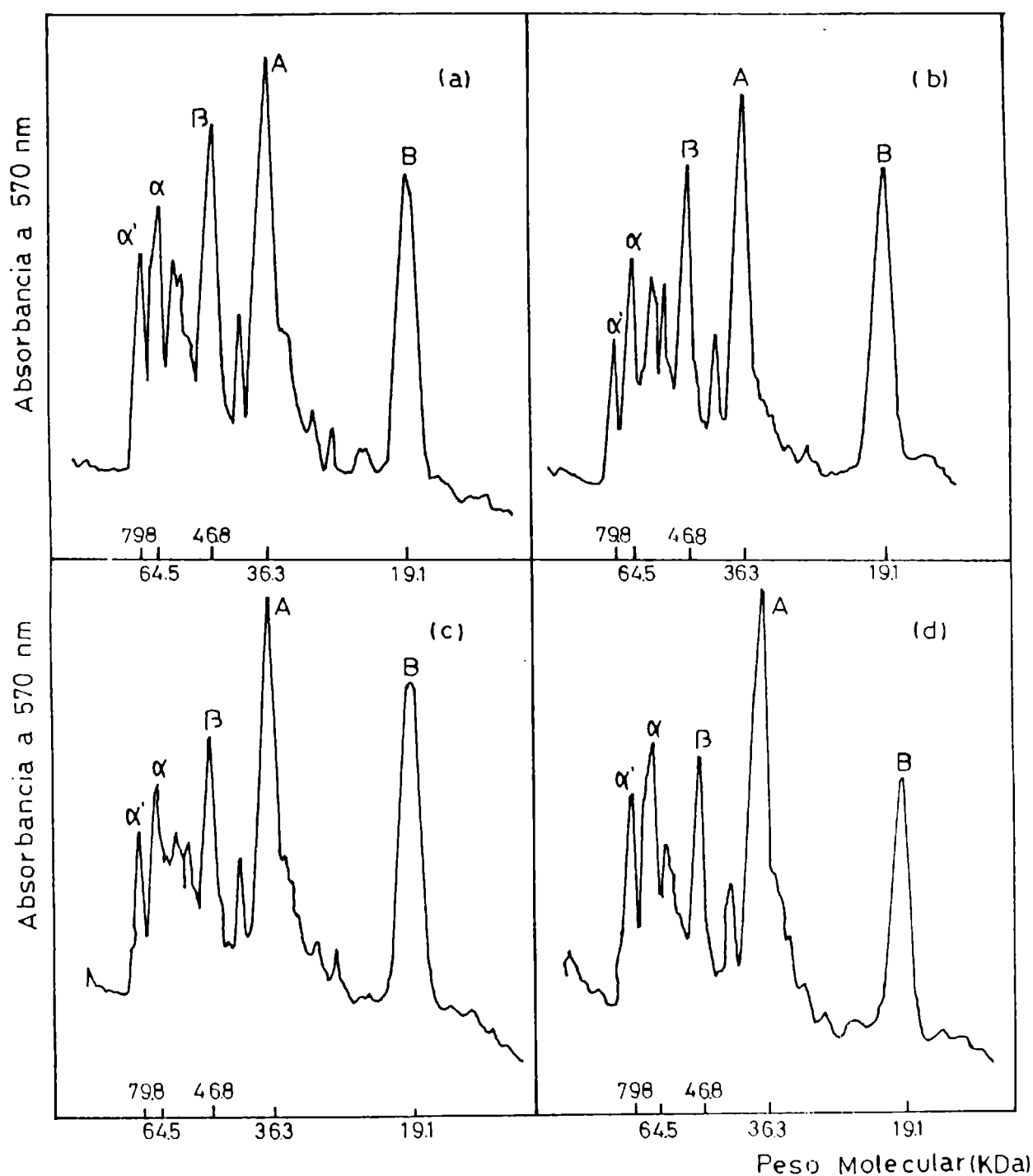
Esto indicaría que los valores de entalpía reflejan fielmente el grado de desplegamiento de las proteínas de soja, puesto que una vez alcanzado el  $\Delta H = 0$  aunque se extienda el tiempo de calentamiento las moléculas no exponen un mayor número de residuos hidrofóbicos. La disminución posterior de la  $S_0$  sería índice de la formación de agregados entre las proteínas en los que participarían uniones hidrofóbicas.

Por último se analizó el efecto de la concentración de proteínas en la solución expuesta a un tratamiento de 100 min a 90°C. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 30c. Puede observarse que a medida que la concentración proteica aumenta (del 5 al 13% p/v) la  $S_0$  disminuye. Esta disminución se debería a la formación de agregados en los que intervendrían grupos hidrofóbicos, agregación que se ve favorecida por el incremento de la concentración de proteínas que facilita la interacción proteína-proteína.

##### 4.1.2.3. Composición proteica de la fracción soluble

A efectos de determinar si la exposición a temperaturas elevadas modifica la composición relativa de las proteínas de soja solubles en agua, se realizaron corridas electroforéticas de soluciones acuosas al 5% de aislados proteicos sometidos a diferentes tratamientos térmicos. La Figura 31 muestra algunos de los perfiles densitográficos característicos obtenidos. El análisis de los mismos revela una disminución de las proporciones correspondientes a la subunidad  $\beta$ -7S y al polipéptido B-11S al aumentar la intensidad del calentamiento. En la Tabla XV se presentan los valores porcentuales correspondientes a cada componente de las proteínas 7 y 11S.

#### 4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO



**Figura 31:** Densitogramas de SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol de las fracciones proteicas solubles en agua correspondiente a aislados de soja obtenidos en el laboratorio, sometidos a diferentes tratamientos térmicos. a: 20°C-30 min; b: 60°C-30 min; c: 77°C-30 min; d: 100°C-30 min.  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ : subunidades de la proteína 7S, A y B: polipéptidos de la proteína 11S.

#### 4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO

**TABLA XV:** Proporción de los componentes de las proteínas 7S y 11S presentes en aislados sometidos a distintos tratamientos térmicos

Aislado	Tratamiento térmico	$\alpha'$	7S			11S	
			$\alpha$	$\beta$		A	B
1	20°C - 30 min	17,1	28,7	54,1		56,3	43,7
2	40°C - 30 min	19,7	29,0	51,3		53,1	47,9
3	60°C - 30 min	11,2	33,4	55,3		50,0	50,0
4	77°C - 30 min	20,0	35,5	44,4		51,9	48,1
5	100°C - 30 min	11,7	42,9	32,6		65,3	34,7
10	90°C - 20 min	22,4	34,9	42,7		52,1	47,9
11	90°C - 45 min	19,2	40,8	40,0		58,0	42,0
12	90°C - 100 min	19,7	44,0	36,0		60,6	39,0
13	90°C - 240 min	23,6	34,0	42,4		60,6	39,4
14	90°C - 360 min	27,1	36,7	36,2		66,7	33,3

Los porcentajes de cada subunidad/polipéptido se calcularon considerando en forma independiente las proteínas 7S y 11S; en cada caso el valor 100% corresponde a la sumatoria de las áreas de las subunidades 7S o de los polipéptidos 11S.

#### 4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO

Dichos porcentajes se han calculado considerando en forma independiente las proteínas 7S y 11S; en cada caso el valor 100% corresponde a la sumatoria de las áreas de las subunidades 7S o de los polipéptidos 11S.

Los resultados obtenidos muestran que la disminución en el contenido de la subunidad  $\beta$ -7S se hace evidente luego de un tratamiento de 30 min a 77°C o de 100 min a 90°C, tratamientos que a su vez ocasionaban el máximo desplegamiento de las cadenas polipeptídicas ( $\Delta H = 0$ ;  $S_0$  máxima). Igual comportamiento exhibe el polipéptido B de la proteína 11S.

Estas fracciones se encontrarían formando parte de agregados algunos de los cuales pueden ser insolubles en agua. Sin embargo, parte de ellos permanece en la fracción soluble tal como lo indica la presencia de proteínas en el gel apilador, especialmente en el caso de las muestras sometidas a un calentamiento energético. Cabe señalar además, que estos agregados de alto peso molecular no son disociados por el tratamiento que se aplica a cada muestra antes de ser sembrada en el gel de poliacrilamida (calentamiento a 100°C en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol). Esto estaría indicando que las fuerzas involucradas en la formación de tales agregados serían de tipo hidrofóbico muy fuerte y/o covalentes y que probablemente requerirían para su disociación tratamientos con otros detergentes o agentes desnaturalizantes.

Utsumi y col. (1984) señalaron que la subunidad  $\beta$ -7S interactúa electrostáticamente con el polipéptido B-11S cuando se calienta una mezcla de proteínas 7S y 11S en presencia de 2-mercaptoetanol, formando agregados solubles en agua. Por otra parte, Nakamura y col. (1986) observaron que el tratamiento térmico de proteínas de soja en ausencia de 2-mercaptoetanol, induce a la formación de complejos solubles en los que participan todas las subunidades provenientes de la disociación de la proteína 7S con las moléculas de globulina 11S. Estos complejos estarían estabilizados por fuertes interacciones hidrofóbicas. Estos mismos autores comprobaron que la



#### 4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO

interacción entre proteínas 7S y 11S es afectada por la proporción relativa de cada una de ellas en la mezcla.

Nuestros resultados coinciden con estas apreciaciones, dado que muestran una fuerte afinidad de la subunidad  $\beta$ -7S y el polipéptido B, así como la presencia de fuertes uniones hidrofóbicas estabilizando los agregados formados.

En nuestro caso el tratamiento térmico se efectuó en ausencia de 2-mercaptoetanol; sin embargo se produjo la ruptura de un cierto número de uniones disulfuro permitiendo la interacción del polipéptido B-11S con la subunidad  $\beta$ -7S. Este hecho podría explicarse considerando que el tratamiento térmico aumenta la velocidad de las reacciones de intercambio SH/S-S.

Dado que todos los tratamientos térmicos discutidos se efectuaron sobre soluciones al 5% de aislado en agua se quiso determinar, al igual que en el estudio de la  $S_0$ , el efecto de la concentración de proteína. Los densitogramas obtenidos en estos casos se muestran en la Figura 32. El análisis de las cantidades relativas de las subunidades/polipéptidos de las proteínas 7S y 11S en los distintos densitogramas revela una disminución de la subunidad  $\beta$ -7S y del polipéptido B al incrementarse la concentración. Además es posible observar un decrecimiento de todas las subunidades que conforman la proteína 7S, hecho que implicaría la formación de agregados insolubles en agua en los que intervendrían no sólo  $\beta$ -7S/B-11S sino también las subunidades  $\alpha'$  y  $\alpha$  de  $\beta$ -conglucina. El aumento relativo del polipéptido A respecto al resto de las fracciones proteicas indicaría una mayor resistencia del mismo al tratamiento térmico y su no participación en la formación de agregados al ser aumentada la concentración de proteínas.

Estos resultados indican que la naturaleza de la agregación proteica inducida por tratamiento térmico depende en alto grado de la concentración de proteínas en la que se realice el tratamiento.

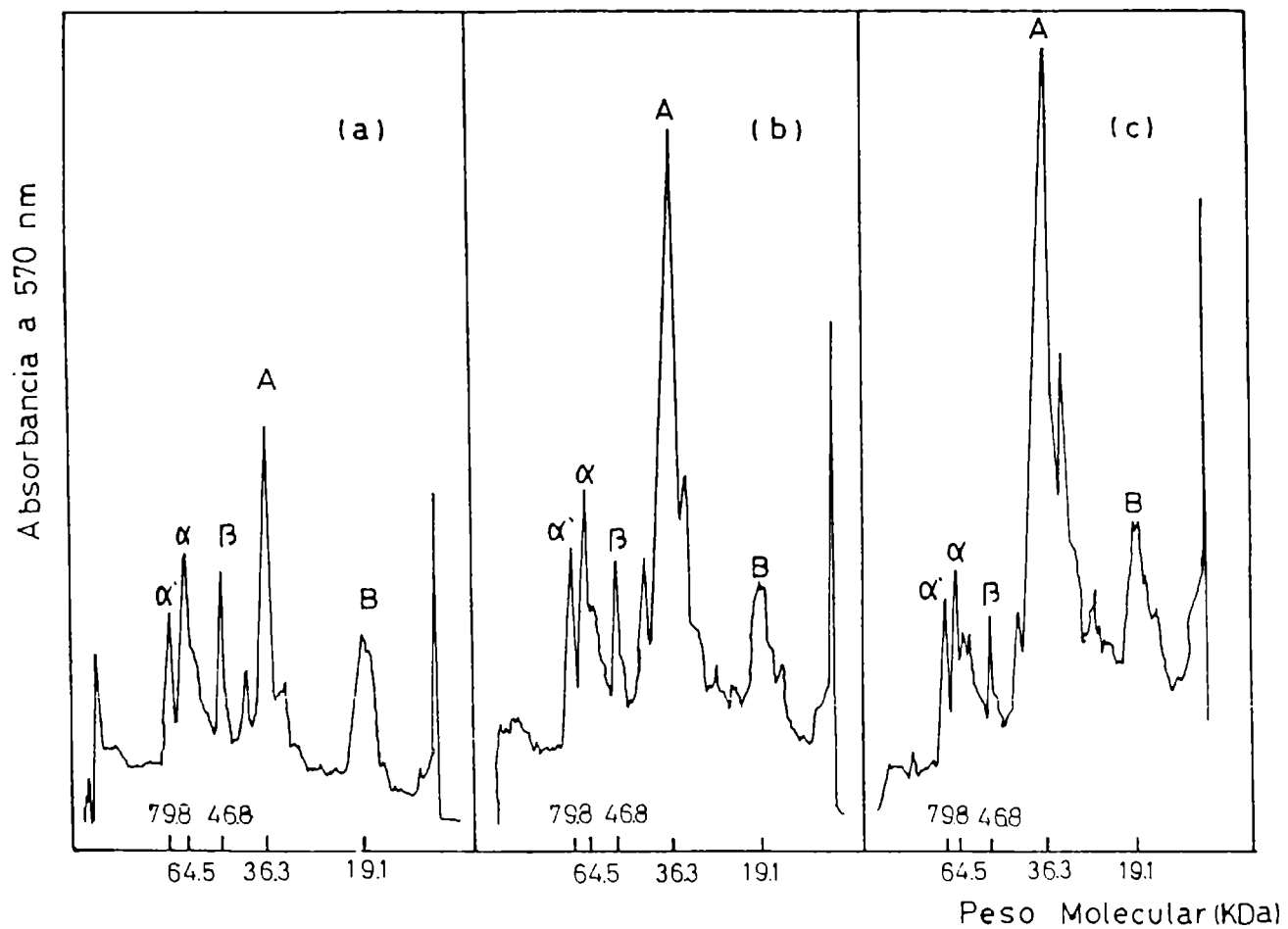


Figura 32: Densitogramas de SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol de las fracciones proteicas solubles en agua de aislados de soja obtenidos en el laboratorio, calentados durante 100 min-90°C a distintas concentraciones proteicas. a: 3% (p/v); b: 8% (p/v); c: 13% (p/v).  $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ : subunidades de la proteína 7S, A y B: polipéptidos de la proteína 11S.

##### 4.1.2.4. Contenido de grupos sulfhidrilos libres

Otra de las determinaciones realizadas fue el contenido de grupos sulfhidrilos libres de soluciones al 5% en agua de aislados proteicos tratados térmicamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla XVI. En la misma se puede observar que a medida que el tratamiento térmico se intensifica, ya sea por aumento de la temperatura o del tiempo de exposición, el contenido de grupos SH libres de las proteínas disminuye notablemente. Esto es índice de la existencia de reacciones de oxidación y reacciones de intercambio SH/S-S durante el período de calentamiento. Esta oxidación se ve favorecida, fundamentalmente, por el desplegamiento de la estructura de la proteína 11S.

##### 4.1.2.5. Solubilidad y capacidad de absorción de agua

Como hemos visto la exposición de las proteínas de soja a altas temperaturas tiene como consecuencia cambios en su estructura evidenciados por un aumento del grado de desnaturalización y de la hidrofobicidad superficial de las moléculas, una disminución del contenido de grupos sulfhidrilos libres y una variación en la proporción de los componentes solubles en agua que conforman las globulinas 7S y 11S. Una vez analizados estos cambios deseabamos conocer su incidencia sobre la funcionalidad de las proteínas; para ello se determinó la solubilidad y la capacidad de absorción de agua de los diferentes aislados calentados. En la Tabla XVII se presentan los valores de solubilidad obtenidos. El análisis de la misma muestra que la solubilidad de las proteínas en agua disminuye sólo cuando el tratamiento térmico se realiza sobre soluciones con una concentración de proteínas superior al 5% p/v. A concentraciones menores (3-5%) la mayor parte de las proteínas permanece soluble aún luego de calentamientos que conducen a un grado de desnaturalización total.

**4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO**

**TABLA XVI:** Contenido de grupos sulfhidrilos libres de aislados proteicos de soja sometidos a distintos tratamientos térmicos

Aislado	Tratamiento térmico	Grupos -SH libres (μmol/g)
1	20°C - 30 min	1,54
2	40°C - 30 min	1,28
3	60°C - 30 min	0,61
4	77°C - 30 min	0,84
5	100°C - 30 min	0,55
9	90°C - 0 min	1,78
12	90°C - 100 min	0,53
13	90°C - 240 min	0,51
14	90°C - 360 min	0,56

4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO

TABLA XVII: Solubilidad de los aislados proteicos de soja tratados térmicamente

Aislado	Tratamiento térmico		Solubilidad
1	20°C - 30 min	(5%)	85,5
2	40°C - 30 min	(5%)	84,5
3	60°C - 30 min	(5%)	88,5
4	77°C - 30 min	(5%)	84,5
5	100°C - 30 min	(5%)	86,5
6	50°C - 60 min	(5%)	88,5
7	70°C - 60 min	(5%)	84,5
8	90°C - 60 min	(5%)	86,7
9	90°C - 0 min	(3%)	89,0
10	90°C - 20 min	(3%)	88,2
11	90°C - 45 min	(3%)	86,7
12	90°C - 100 min	(3%)	86,6
13	90°C - 240 min	(3%)	88,7
14	90°C - 360 min	(3%)	89,9
15	90°C - 100 min	(3%)	89,4
16	90°C - 100 min	(8%)	34,8
17	90°C - 100 min	(13%)	14,5

En la columna "tratamiento térmico" el valor entre paréntesis corresponde a la concentración de proteínas en la que se realizó dicho tratamiento.

#### 4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO

La disminución pronunciada de la solubilidad a concentraciones de proteínas del 8 y 13% p/v coincide, tal como se discutió previamente, con una disminución de la  $S_0$  y de la cantidad de subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  y  $\beta$ -7S y del polipéptido básico de la proteína 11S, los que evidentemente están formando parte de agregados no solubles.

En la Figura 33 se puede observar la variación de la capacidad de absorción de agua, WIC, de los distintos aislados tratados térmicamente. Los resultados indican que a medida que el grado de desnaturalización proteica aumenta (aislados 1-5, Tabla XIV) la WIC se incrementa. También se observa que la mayor capacidad de absorción de agua se alcanza para los aislados con mayor proporción de proteínas insolubles (Tabla XVII, aislados 16 y 17). Este último hecho reafirma lo observado anteriormente con aislados comerciales (Item 3.2.2.) que la capacidad para formar una red que absorba agua no depende solamente del desplegamiento de las moléculas de proteínas sino también de su capacidad de agregación.

##### 4.1.3. Efecto del agregado de calcio

Al comenzar este capítulo se mencionó que el agregado de sales, durante el proceso de obtención de los aislados de proteínas de soja, también podía modificar sus características. Dado que en los aislados de origen comercial se detectaron diferencias importantes en el contenido de Ca, las que se vincularon con la variación detectada en ciertas propiedades funcionales, deseamos corroborar e indagar en este sentido. Para ello se prepararon en el laboratorio aislados de soja a los que se agregó diversas cantidades de cloruro o hidróxido de calcio (Materiales y Métodos, sección 2.1.2.3.c). En el primer caso todos los aislados preparados fueron tratados térmicamente a efectos de lograr la desnaturalización total de sus

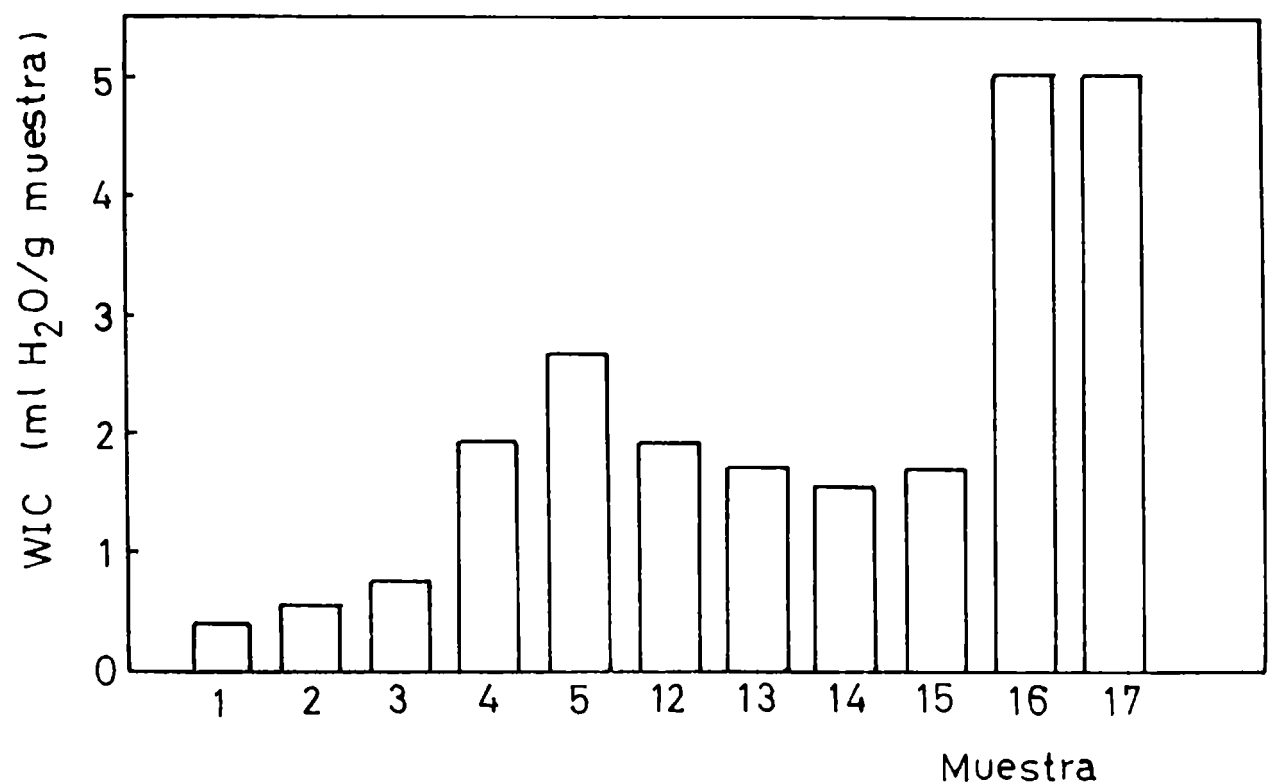


Figura 33: Capacidad de absorción de agua (WIC) de aislados proteicos de soja obtenidos en el laboratorio y sometidos a distintos tratamientos. Muestras 1, 2, 3, 4 y 5: soluciones acuosas al 5% (p/v) de aislados de soja calentados durante 30 min a 20°C, 40°C, 60°C, 77°C y 100°C, respectivamente. Muestras 12, 13 y 14: soluciones al 5% (p/v) calentadas a 90°C durante 100 min, 240 min y 360 min, respectivamente. Muestras 15, 16 y 17: dispersiones al 3%, 8% y 13% (p/v) respectivamente calentadas durante 100 min a 90°C.

#### 4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO

proteínas, en tanto que en el segundo caso para cada agregado de calcio efectuado se obtuvieron dos muestras una con proteínas nativas (no calentadas) y otra con proteínas totalmente desnaturalizadas. En ambos casos se analizaron las siguientes propiedades funcionales: solubilidad, capacidad de absorción de agua y capacidad de emulsificación. En los aislados con agregado de  $\text{CaCl}_2$  se determinó además la hidrofobicidad superficial de las proteínas solubles.

##### 4.1.3.1. Comportamiento de la solubilidad e hidrofobicidad superficial de aislados tratados con $\text{CaCl}_2$

Anteriormente se mostró que tratamientos térmicos de soluciones al 5% p/v de aislados de soja que provocaban la desnaturalización total de sus proteínas no alteraban la solubilidad en agua de las mismas (Tabla XVII). Sin embargo, si se realizan dichos tratamientos en iguales condiciones pero en presencia de  $\text{CaCl}_2$  se observa una disminución significativa de la solubilidad; disminución que depende de la concentración de  $\text{CaCl}_2$  presente (Figura 34). Hasta contenidos de 15 mg Ca/g proteína, el decrecimiento de la solubilidad es gradual y reducido; superado este valor y hasta 24 mg Ca/g proteína el cambio detectado es abrupto alcanzándose valores de solubilidad del 13% (lo que equivale a una insolubilización de proteínas de un 86%). Esta observación sugiere que, en las condiciones ensayadas la agregación de las proteínas se produce a través de un mecanismo cooperativo.

En cuanto a la hidrofobicidad superficial, es posible observar en la Figura 34, que sigue un comportamiento semejante al descrito para la solubilidad. Cabe recordar que las proteínas fueron tratadas térmicamente en condiciones tales que su desplegamiento es total y por ende su  $S_0$  máxima. Por lo tanto la variación de  $S_0$  detectada en presencia de contenidos crecientes de calcio se vincularía fundamentalmente a la variación en el



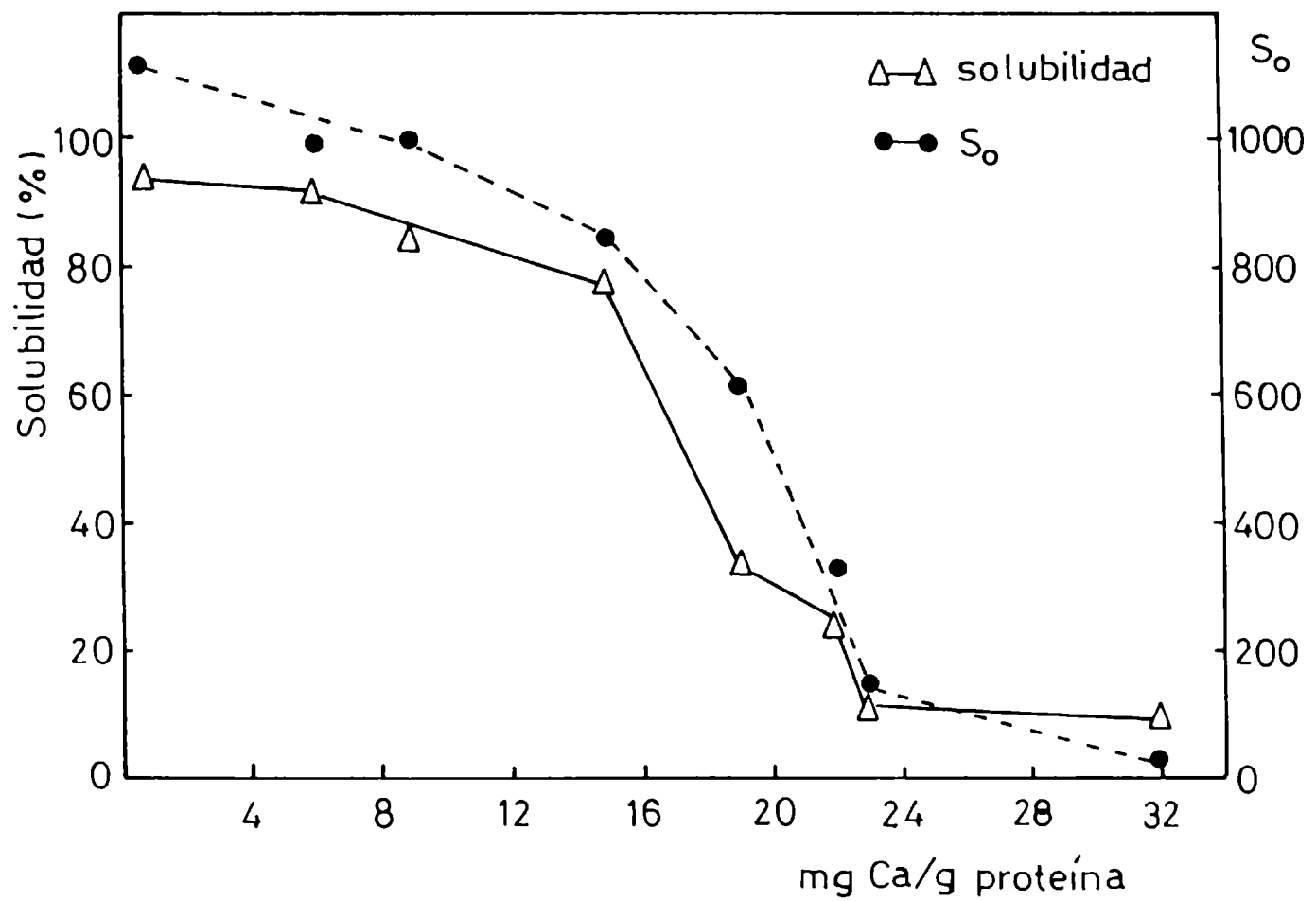


Figura 34: Variación de la solubilidad y la hidrofobicidad superficial ( $S_0$ ) con el contenido de calcio de aislados proteicos de soja preparados en el laboratorio con  $\text{CaCl}_2$  y calentados.

#### 4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO

estado de agregación de las proteínas de soja. El calcio, tal como se mencionó previamente, puede actuar como puente entre grupos cargados negativamente pertenecientes a una o distintas cadenas proteica. Además la disminución de la  $S_0$  indicaría que la agregación produjo un acercamiento entre grupos hidrofóbicos, quedando éstos involucrados en alguna unión proteína-proteína o no accesibles al reactivo empleado para su determinación. La Figura 35 muestra la existencia de una relación lineal entre la hidrofobicidad superficial de las proteínas de soja y su solubilidad, en presencia de iones calcio.

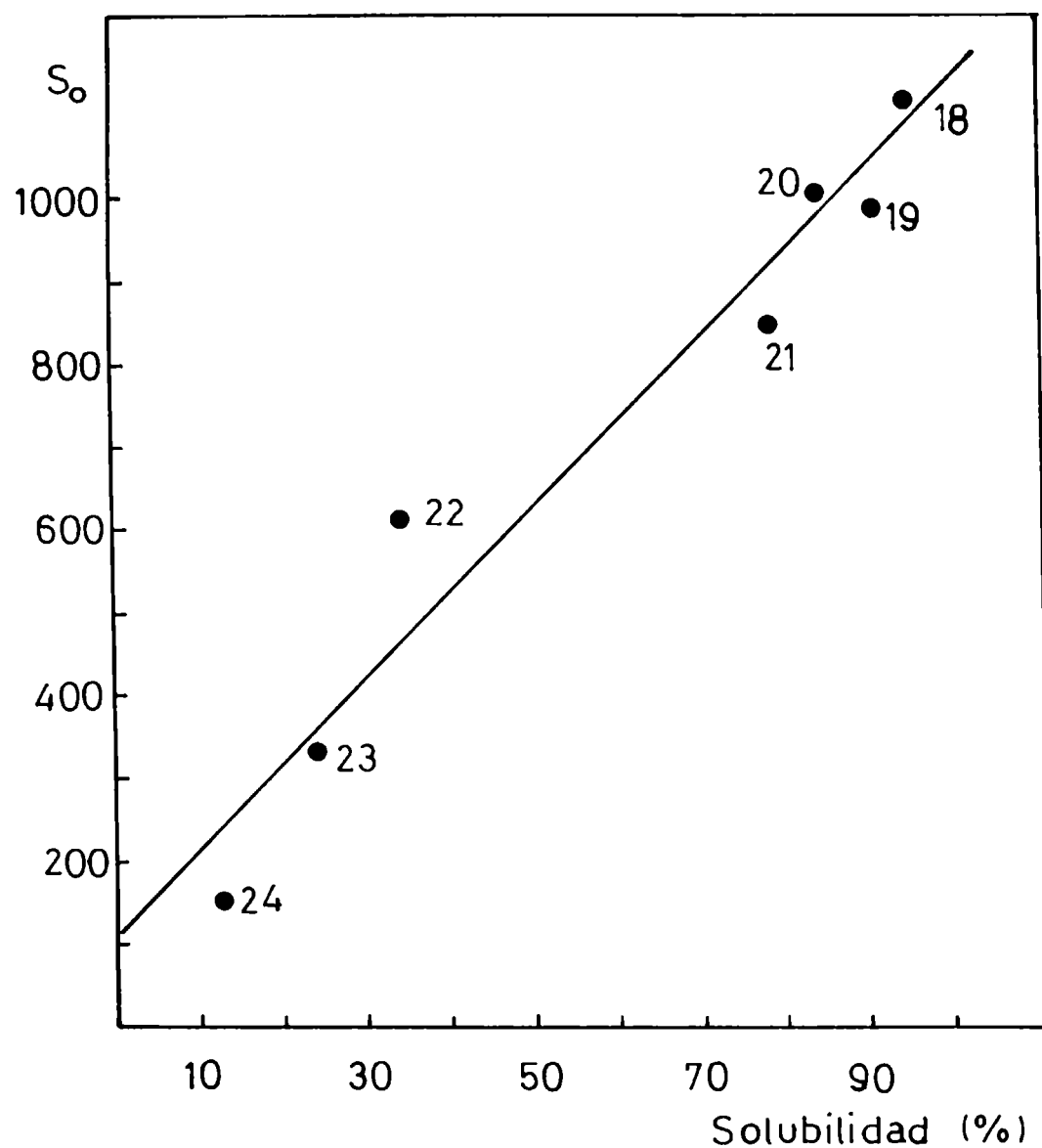
##### 4.1.3.2. Capacidad de absorción de agua de aislados tratados con $\text{CaCl}_2$

Además de la solubilidad de las proteínas de soja se midió su capacidad para absorber agua después de haber sido tratadas térmicamente en presencia de  $\text{CaCl}_2$ .

La Figura 36 (a y b) muestra que la WIC se incrementa al disminuir la solubilidad hasta un valor no mayor del 60-65%. Evidentemente, y tal como se había sugerido al analizar los resultados sobre WIC de los aislados proteicos de soja de origen comercial (Item 3.2.2.), se requiere, a efectos de retener una cantidad de agua apreciable, la formación de una red de agregados no muy compactos. Queda claro que tanto en la capacidad de formación de la red como en sus características la solubilidad de las proteínas juega un rol sumamente importante.

##### 4.1.3.3. Capacidad de emulsificación de aislados tratados con $\text{CaCl}_2$

En el estudio llevado a cabo con los aislados comerciales de proteínas de soja se mostró que la capacidad de emulsificación que éstos exhibían tenía una buena correlación con la hidrofobicidad superficial de las moléculas. Dado que el agregado de calcio induce una disminución de la  $S_0$ ,



**Figura 35:** Correlación existente entre la solubilidad y la hidrofobicidad superficial ( $S_0$ ) de proteínas de soja presentes en aislados de laboratorio preparados con  $\text{CaCl}_2$  y calentados. Las muestras 18, 19, 20, 21, 22, 23 y 24 poseen respectivamente 0,5, 5,9, 8,9, 14,9, 19,0, 21,8, 22,6 y 32,1 mg Ca/g de proteína del aislado.

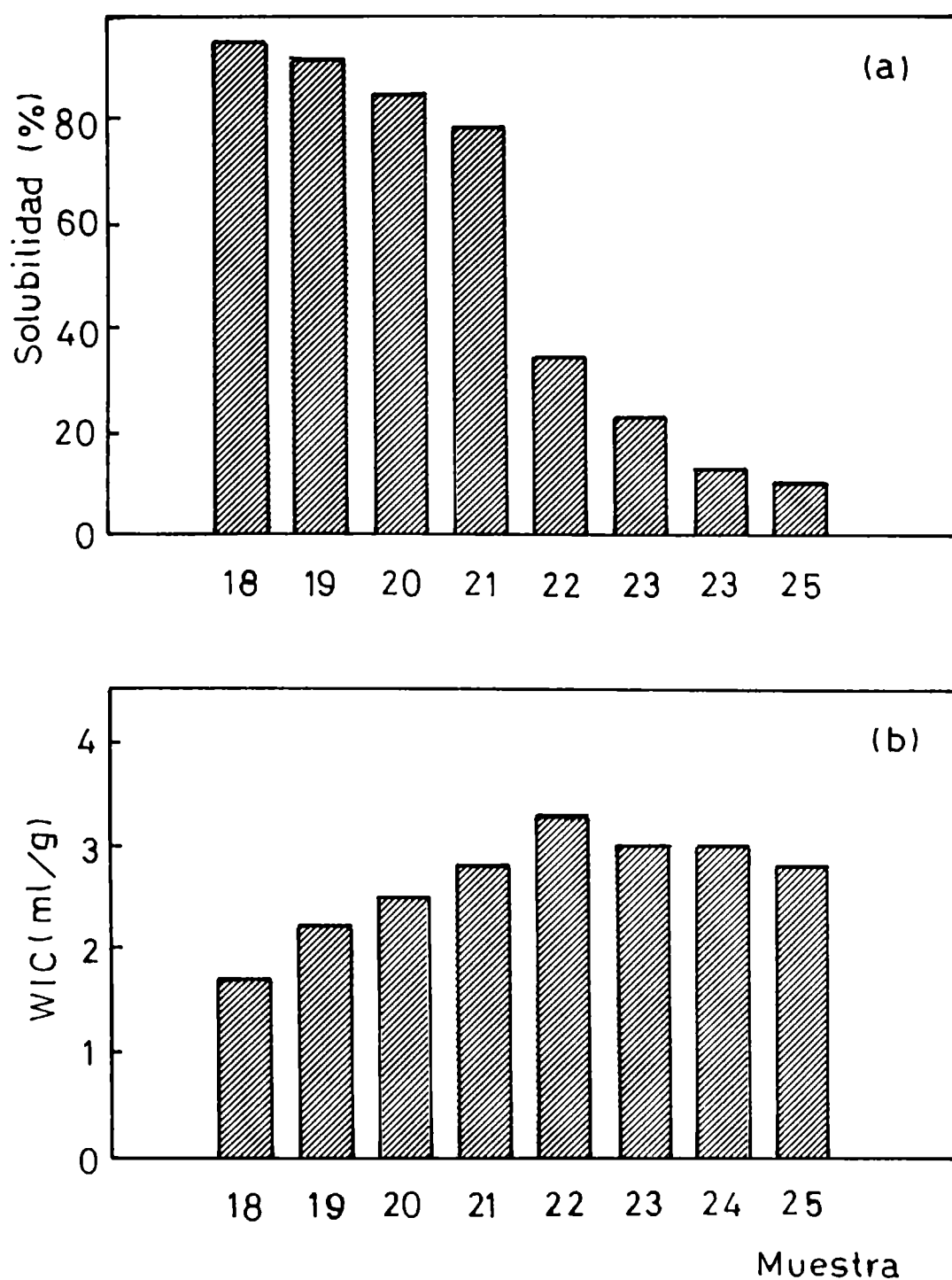


Figura 36: a) Solubilidad y b) capacidad de absorción de agua (WIC) de aislados proteicos de soja de laboratorio preparados con  $\text{CaCl}_2$  y calentados. Las muestras 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 poseen respectivamente 0,5, 5,9, 8,9, 14,9, 19,0, 21,8, 22,6 y 32,1 mg Ca/g de proteína del aislado.

#### **4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO**

decidimos corroborar la correlación mencionada. En la Figura 37a se observa que a medida que se incrementa la  $S_0$  de las proteínas constituyentes de los diferentes aislados se incrementa su EC, verificándose la conclusión mencionada anteriormente.

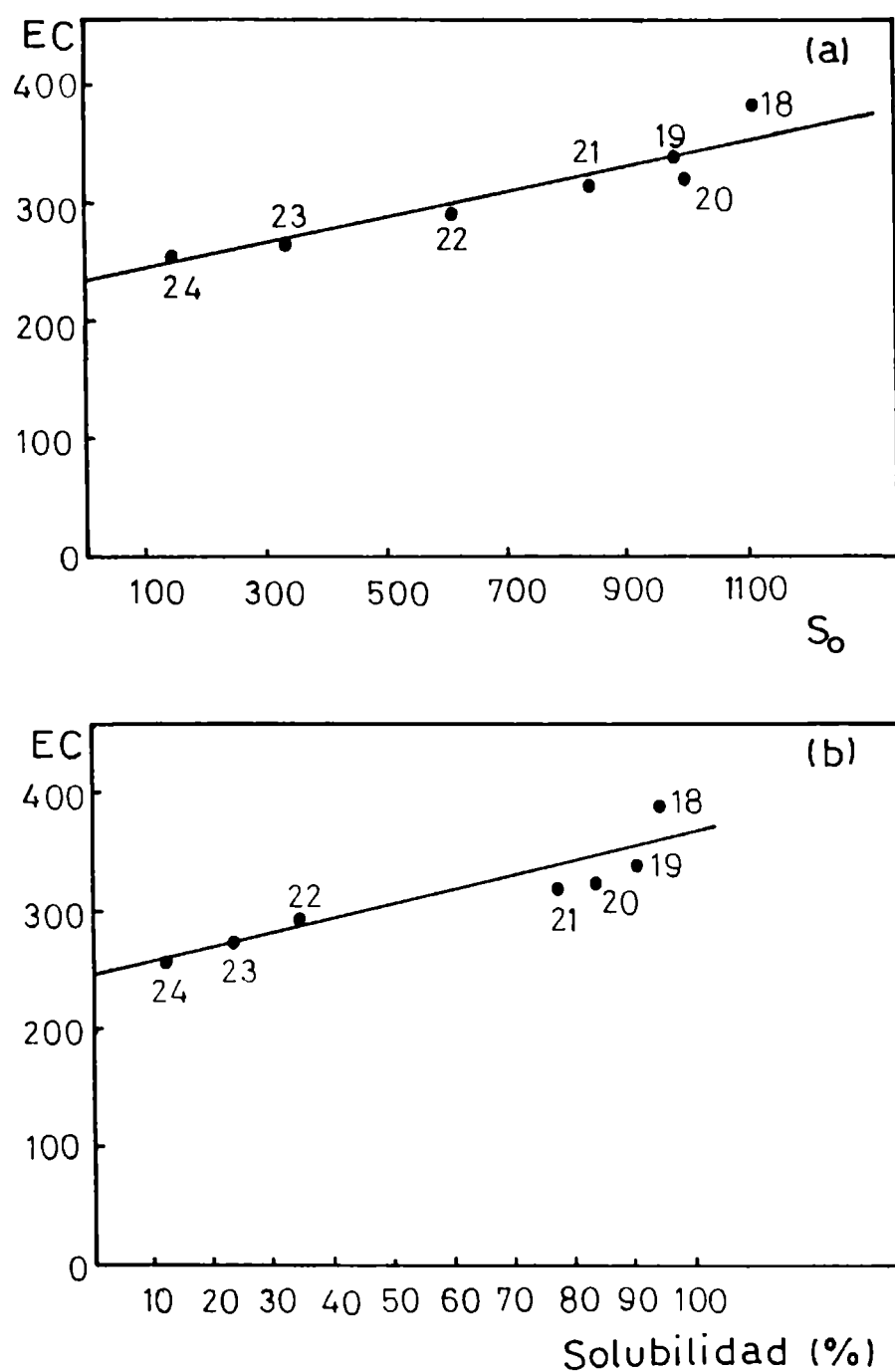
En la Figura 37b se muestra que la solubilidad correlaciona de igual manera con la EC.

##### **4.1.3.4. Solubilidad de aislados tratados con $\text{Ca(OH)}_2$ con proteínas nativas o desnaturalizadas**

En la Figura 38 se han graficado los datos de solubilidad obtenidos, tanto para los aislados con proteínas nativas como desnaturalizadas, en función del contenido de calcio. En la misma se puede observar que en ambos casos la solubilidad disminuye por agregado de calcio; sin embargo, si las proteínas se encuentran desplegadas, una dada disminución de la solubilidad se alcanza a contenidos de calcio sensiblemente menores. Este comportamiento podría explicarse teniendo en cuenta que la desnaturalización proteica en determinadas condiciones, como las aquí empleadas, favorece la agregación debido al aumento de la hidrofobicidad superficial de las moléculas y/o permite una mayor exposición de los grupos con los cuales interactúa el Ca. Cabe además señalar que el agregado de  $\text{Ca(OH)}_2$  produce una disminución de la solubilidad proteica mayor que la ocasionada por la adición de  $\text{CaCl}_2$  (Figuras 34 y 38), lo que muestra la importancia del tipo de ion que interacciona con la proteína y el medio que la rodea.

##### **4.1.3.5. Capacidad de absorción de agua de aislados con proteínas nativas o desnaturalizadas tratados con $\text{Ca(OH)}_2$**

El análisis de los resultados obtenidos (Figura 39a y b) muestra que la capacidad de absorción de agua de los aislados de soja es máxima para



**Figura 37:** a) Capacidad de emulsificación (EC) de los aislados proteicos de soja de laboratorio obtenidos con  $\text{CaCl}_2$  y calentados, en función de la hidrofobicidad superficial ( $S_0$ ). b) EC de las mismas muestras en función de la solubilidad. Las muestras 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 poseen respectivamente 0,5, 5,9, 8,9, 14,9, 19,0, 21,8, 22,6 y 32,1 mg Ca/g de proteína del aislado. La EC se expresó en gramos de aceite/gr de aislado.

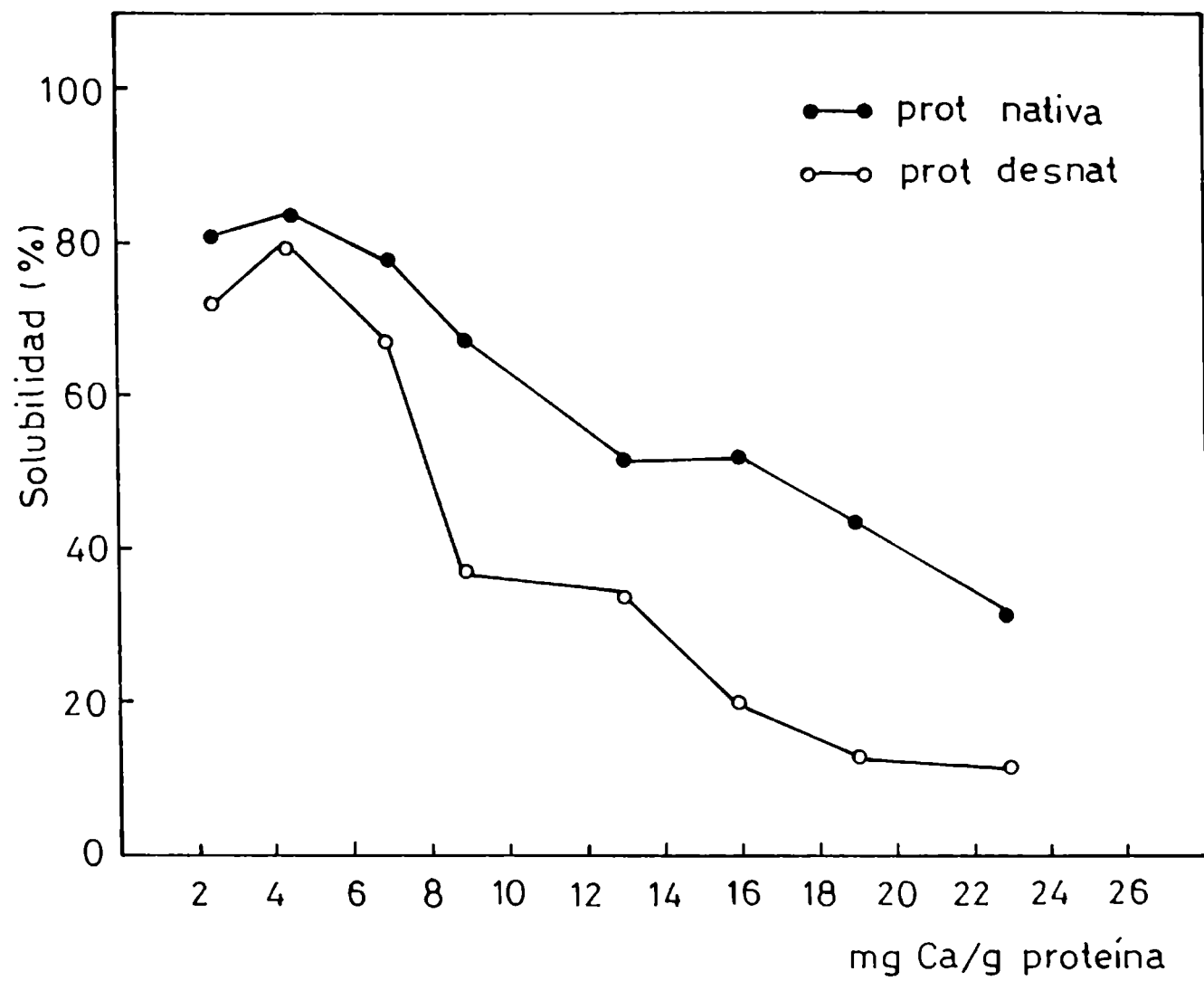


Figura 38: Variación de la solubilidad con el contenido de calcio de aislados proteicos de soja de laboratorio preparados con  $\text{Ca(OH)}_2$  y calentados.

4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO

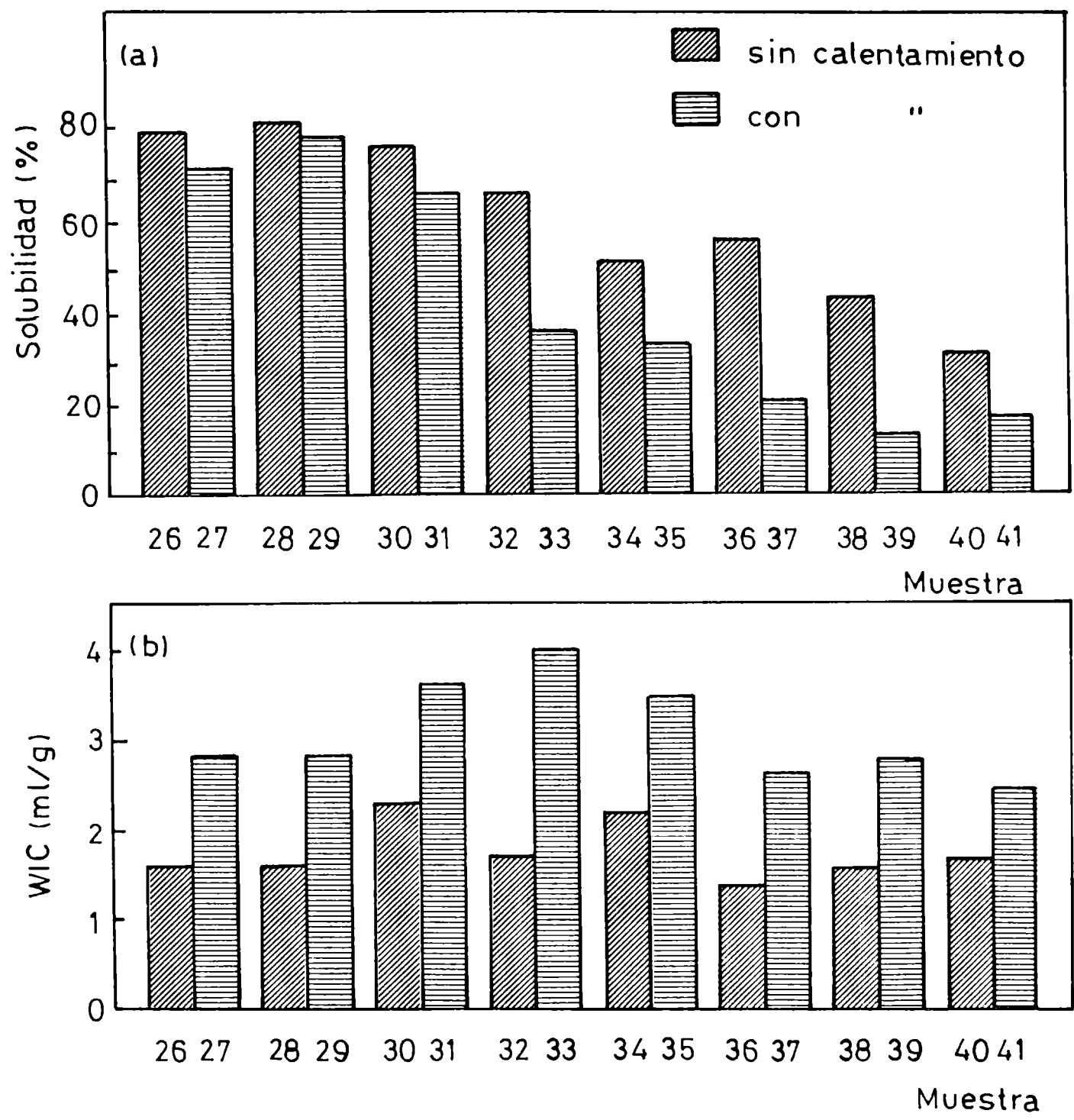


Figura 39: a) Solubilidad y b) capacidad de absorción de agua (WIC) de aislados proteicos de soja de laboratorio preparados con  $\text{Ca(OH)}_2$ . Las muestras 26-27, 28-29, 30-31, 32-33, 34-35, 36-37, 38-39 y 40-41 poseen respectivamente 2,6, 4,6, 6,8, 9,1, 12,7, 16,1, 19,4 y 22,8 mg de Ca/g de proteína del aislado. Las muestras con numeración impar han sido tratadas térmicamente.



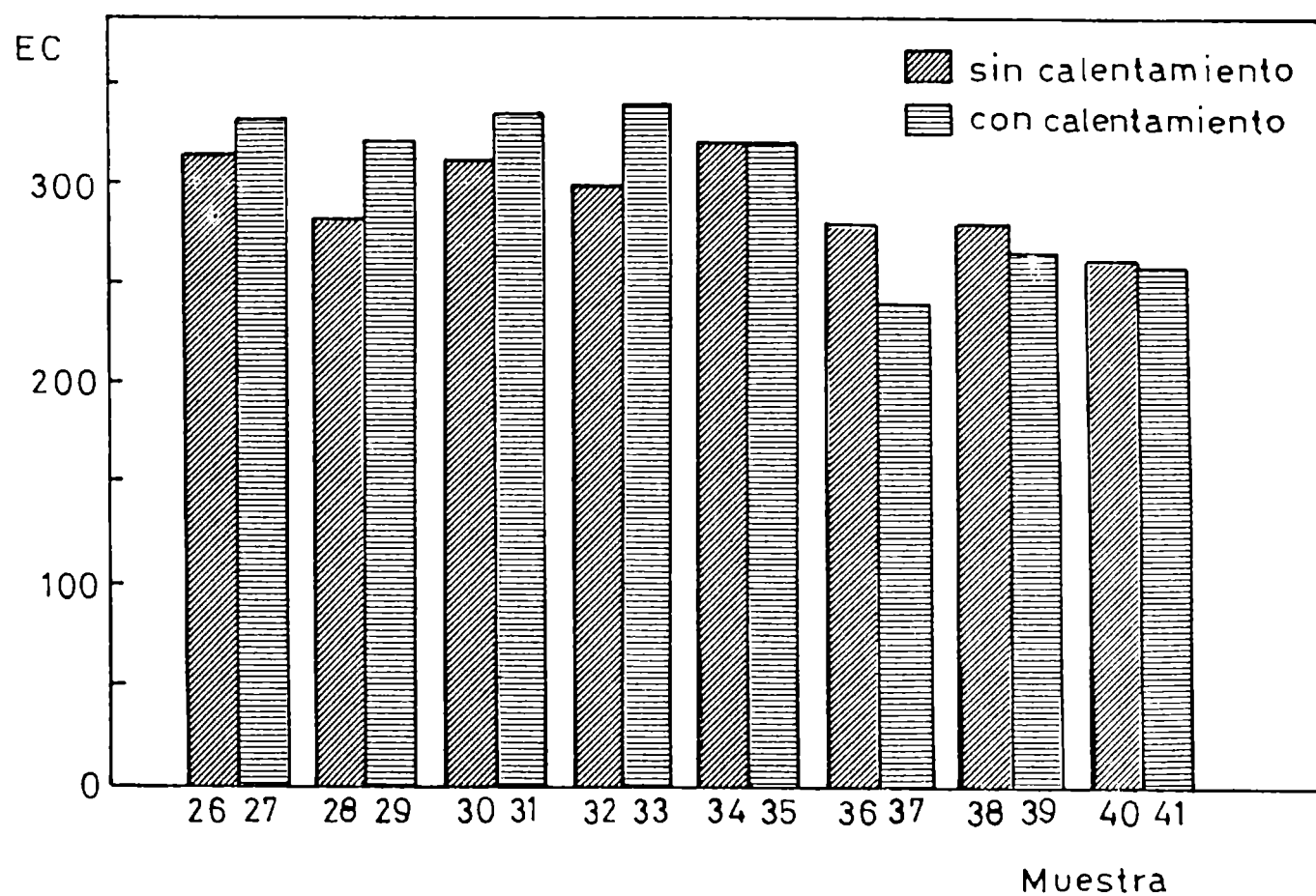
#### **4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO**

valores intermedios de solubilidad, siempre y cuando las proteínas se encuentren totalmente desplegadas. El agregado de calcio a proteínas nativas provoca una disminución de la solubilidad, pero ésta no está acompañada por un claro aumento de la WIC. De las ocho muestras analizadas sólo dos mostraron un aumento de la capacidad de absorción de agua, capacidad que por otra parte es inferior a la registrada para cualquiera de los aislados tratados térmicamente. Estos resultados parecerían indicar que la capacidad para retener agua es dependiente fundamentalmente de las características de los agregados formados; por ejemplo, de su mayor o menor grado de compactación. Esto podría también explicar la disminución de la WIC a valores de solubilidad muy bajos.

##### **4.1.3.6. Capacidad de emulsificación de aislados con proteínas nativas o desnaturalizadas, tratados con $\text{Ca(OH)}_2$**

Si se comparan los valores obtenidos de la capacidad de emulsificación de aislados con proteínas desnaturalizadas o nativas, a igual contenido de calcio, se observa que las diferencias son pequeñas (no mayores del 15%) (Figura 40). Se puede además apreciar que las proteínas nativas poseen una menor EC que las proteínas desnaturalizadas para valores de calcio inferiores a 10 mg/g. Para mayores contenidos de calcio el comportamiento se invierte. Estos resultados están señalando la incidencia de más de un fenómeno en la capacidad de emulsificación. Aparentemente estarían incidiendo tanto la desnaturalización como la agregación proteica. A contenidos de calcio bajos, lo que implica alta solubilidad y baja agregación, el hecho que las proteínas se encuentren previamente desnaturalizadas favorece la EC. En este caso las proteínas poseen una mayor hidrofobicidad y presentan una mayor flexibilidad, lo que mejora su interacción con la fase oleosa.

#### 4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO



**Figura 40:** Capacidad de emulsificación (EC) de los aislados proteicos de soja de laboratorio preparados con  $\text{Ca(OH)}_2$ . Las muestras 26-27, 28-29, 30-31, 32-33, 34-35, 36-37, 38-39 y 40-41 poseen respectivamente 2,6, 4,6, 6,8, 9,1, 12,7, 16,1, 19,4 y 22,8 mg de Ca/g de proteína del aislado. Las muestras con numeración impar han sido tratadas térmicamente. La EC se expresó en gramos de aceite/ gramo de aislado.

#### **4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO**

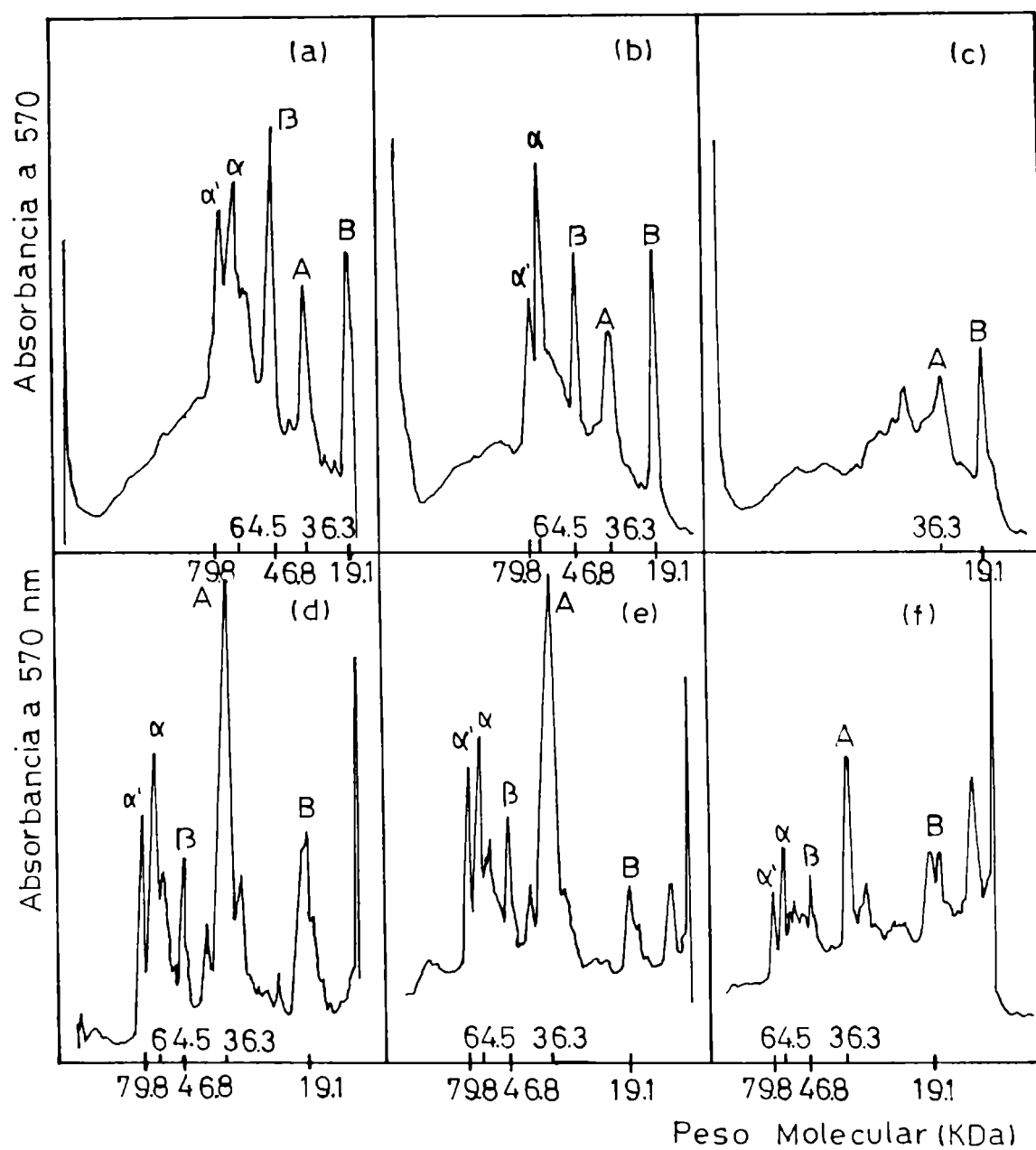
Para valores de calcio altos la agregación es mayor, hecho que se ve favorecido por la desnaturalización de las proteínas. Las proteínas no disueltas contribuyen en menor grado a la capacidad de emulsificación, probablemente debido a que las mismas deben primero disolverse y migrar hacia la interfase aceite-agua antes que sus propiedades de superficie puedan incidir en el mantenimiento o estabilización de la emulsión.

##### **4.1.3.7. Especies proteicas presentes en la fracción soluble de aislados tratados con calcio**

En la Figura 41 se muestran densitogramas tipo correspondientes a las electroforesis SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol de las proteínas solubles en agua de aislados adicionados con  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{Ca(OH)}_2$ . En la misma (Figura 41a-c) se puede observar que el agregado de  $\text{CaCl}_2$  en cantidades crecientes provoca la desaparición en la fracción soluble en agua de todas las subunidades de la proteína 7S y afecta en menor proporción a los polipéptidos A y B de la proteína 11S.

La presencia de  $\text{Ca(OH)}_2$  (Fig. 41d-e) parecería afectar por igual a todos los componentes que conforman las proteínas de soja. El incremento de esta sal va acompañado por la disminución de la solubilidad y perfiles electroforéticos de esos componentes. Este efecto podría atribuirse a la acción diferencial de los cationes y aniones sobre las proteínas. Efecto que también se observó en la determinación de la solubilidad de las muestras analizadas (Figuras 34 y 38).

#### 4. AISLADOS PROTEICOS DE SOJA OBTENIDOS EN EL LABORATORIO



**Figura 41:** Densitogramas de SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol de las fracciones proteicas solubles en agua de aislados de soja preparados con calcio. a, b y c: con  $\text{CaCl}_2$ . d, e y f: con  $\text{Ca(OH)}_2$ .

**CINETICA DE  
DESNATURALIZACION TERMICA  
DE PROTEINAS DE SOJA**

## **5. CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA DE PROTEINAS DE SOJA**

Previamente se ha analizado y discutido el efecto del estado conformacional de las proteínas de soja (proteínas nativas, parcialmente desnaturalizadas y totalmente desnaturalizadas) sobre las propiedades funcionales que ellas exhiben. Se ha visto, que la desnaturalización proteica es inducida por acción de tratamientos térmicos, los cuales se pueden efectuar en distintas etapas del proceso de obtención de los aislados.

A efectos de adquirir un conocimiento más acabado sobre la acción de la temperatura y contar con datos cinéticos y termodinámicos para determinar el efecto de factores ambientales sobre la termolabilidad de las proteínas de soja, se decidió estudiar la cinética de desnaturalización térmica de aislados obtenidos en el laboratorio mediante calorimetría diferencial de barrido. Esta es una técnica simple apropiada para analizar en forma cuantitativa el proceso de desplegamiento de proteínas. A partir de la curva de absorción de calor es posible estimar datos cinéticos del proceso de desnaturalización proteica. Para ello se dispone de distintos métodos los cuales han sido descriptos en forma detallada por Duswalt (1974). Dada la composición de los aislados proteicos de soja y la naturaleza compleja de los termogramas obtenidos decidimos utilizar en la determinación de los parámetros cinéticos el método dinámico (Kissinger, 1956; 1957).

Para llevar a cabo este estudio se emplearon distintas muestras obtenidas en el laboratorio: proteinato de sodio dializado (Na 12,7 mg/g-Ca 1,3 mg/g) y proteínas 7S y 11S parcialmente purificadas.

### **5.1. Aislados proteicos dializados**

En primera instancia se analizarán los resultados obtenidos con los aislados dializados. La Figura 42 muestra dos termogramas típicos de proteínas de soja a pH 6,5 obtenidos a dos velocidades de calentamiento (25° y

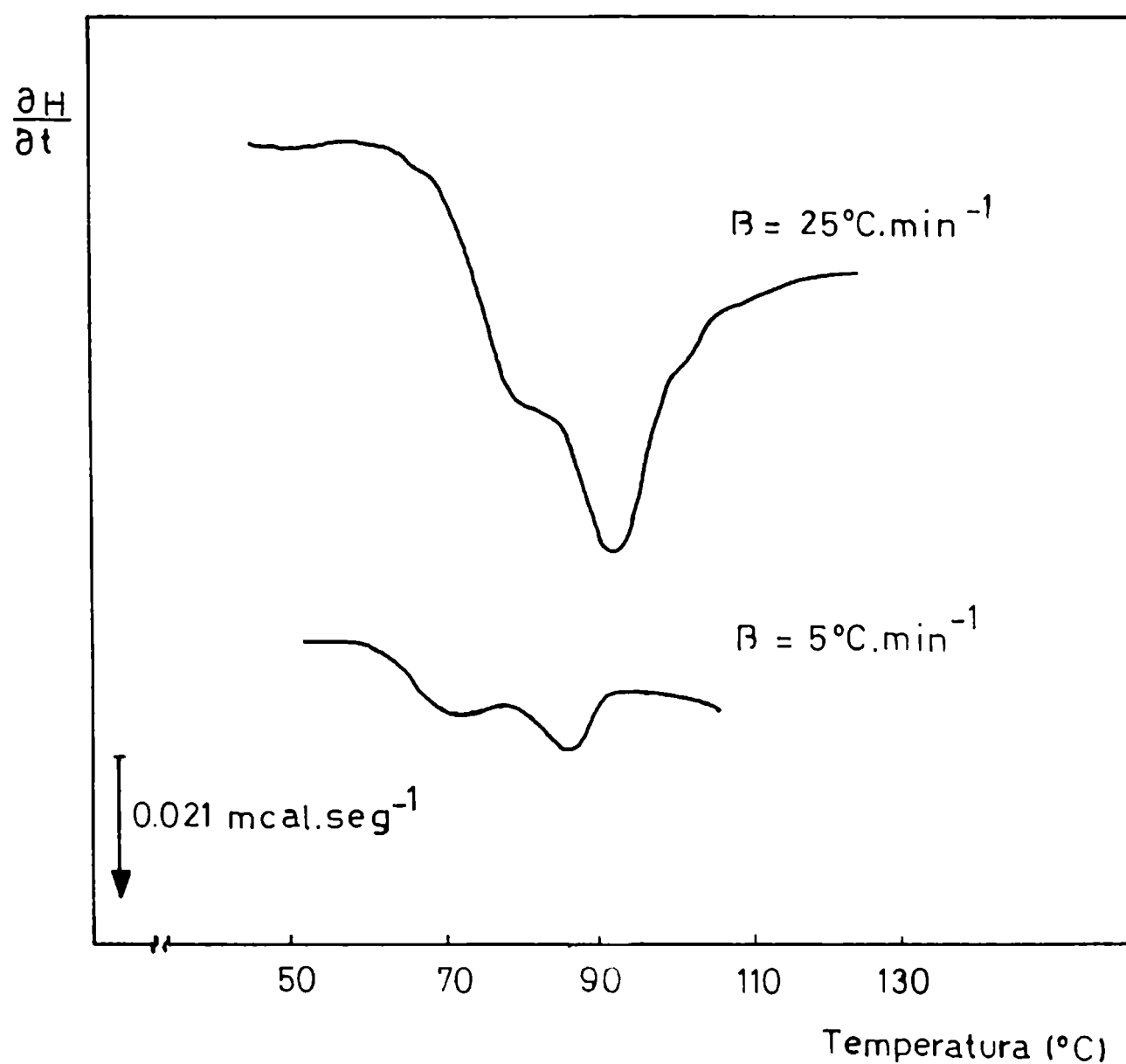


Figura 42: Termogramas de DSC correspondientes a aislados proteicos dializados obtenidos en el laboratorio al 20% (p/v) en agua destilada. Velocidad de calentamiento: 25°C min<sup>-1</sup> y 5°C min<sup>-1</sup>. Sensibilidad 0,021 mcal seg<sup>-1</sup>. p.s.: peso seco.

## 5. CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA DE PROTEINAS DE SOJA

5°C min<sup>-1</sup>). Tal como se mostró previamente, se pueden observar las dos transiciones endotérmicas correspondientes a la desnaturalización de las proteínas 7S (pico I) y 11S (pico II), respectivamente, (Figura 4). La comparación de los dos termogramas muestra claramente que cuanto mayor es la velocidad de calentamiento ( $\beta$ ) empleada los picos obtenidos son más agudos y se corren hacia temperaturas superiores. Este efecto es índice de la existencia de un retardo de la respuesta térmica en el tiempo, el cual provoca un corrimiento de la temperatura máxima de los picos de 10°C (pico I) y 7°C (pico II) para  $\beta = 25^\circ\text{C min}^{-1}$  respecto a  $\beta = 5^\circ\text{C min}^{-1}$ .

Para eliminar el efecto de la velocidad de calentamiento sobre la temperatura de transición se puede graficar la temperatura de máxima deflexión, correspondiente a cada pico, para distintas velocidades de calentamiento y extrapolar a  $\beta = 0^\circ\text{C min}^{-1}$ . De acuerdo a los resultados obtenidos las temperaturas de transición correspondientes a las proteínas 7S y 11S presentes en el aislado dializado son 70.2°C y 86.0°C, respectivamente (Figura 43a y b).

La entalpía de desnaturalización aparente, calculada de acuerdo a la ecuación (1) (Materiales y Métodos, sección 2.3.2) para cualesquiera de las velocidades de calentamiento empleadas fue de  $3,6 \pm 0,4$  cal/g. Este valor es concordante con los obtenidos por Arntfield y Murray (1981) y Wagner y Añón (1990).

Cabe señalar que el proceso de desnaturalización de las proteínas de soja es esencialmente irreversible al superar un cierto tiempo de calentamiento, tal como lo indica la no existencia de transiciones térmicas al volver a correr una muestra ya calentada (los resultados no se muestran).

Para poder calcular, mediante el método dinámico, los parámetros correspondientes a la cinética de desnaturalización térmica de las proteínas de soja es necesario determinar las temperaturas de máxima deflexión correspondientes a los picos I (proteína 7S) y II (proteína 11S) a partir de



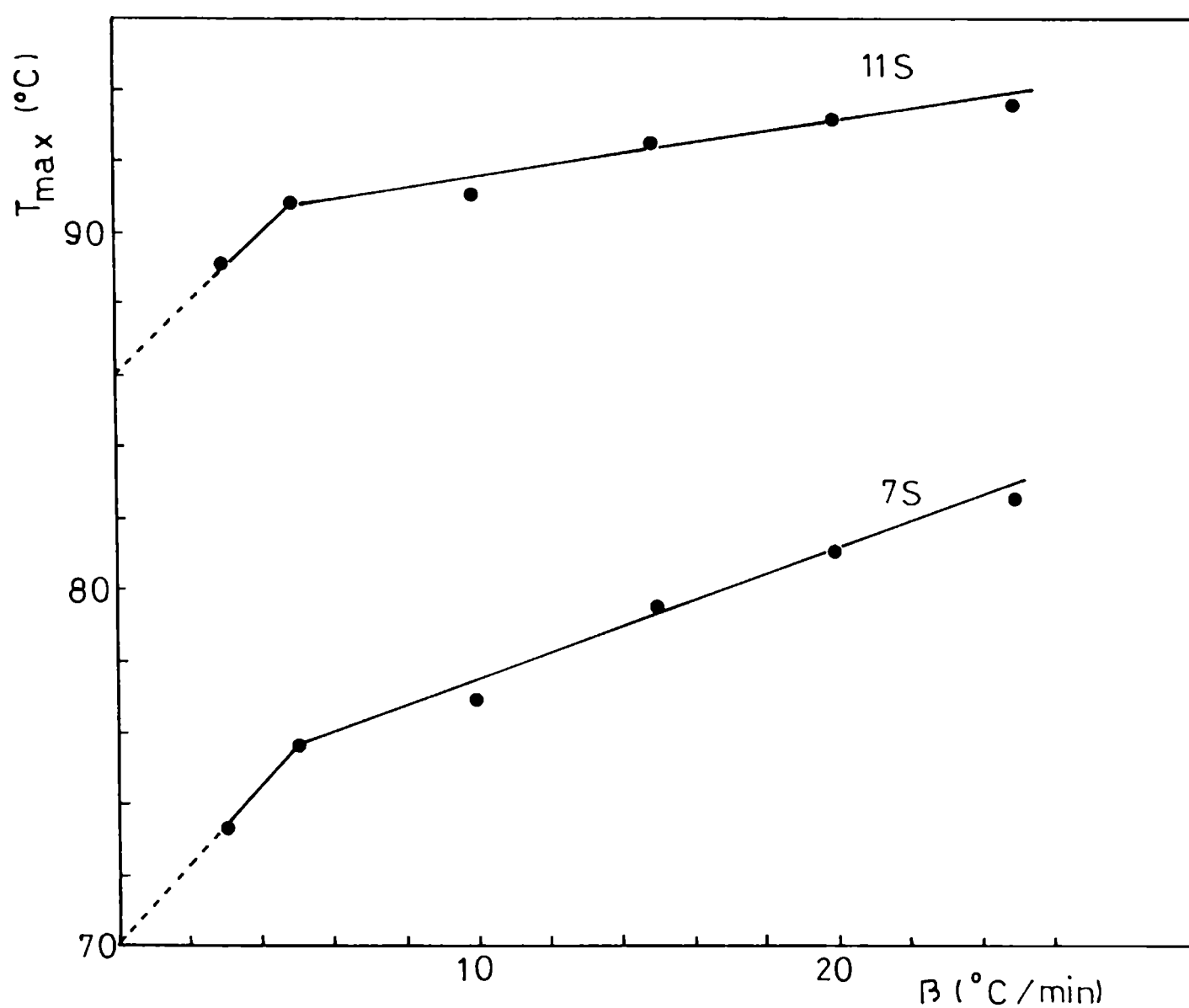


Figura 43: Relación de la temperatura máxima de pico con la velocidad de calentamiento. a) pico 1: proteína 7S; b) pico 2: proteína 11S.

## 5. CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA DE PROTEINAS DE SOJA

termogramas obtenidos a distintas velocidades de calentamiento. En la Tabla XVIII se muestran los  $T_{\max}$  medios para  $\beta = 3, 5, 10, 15, 20$  y  $25^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

De acuerdo a la ecuación teórica desarrollada por Ozawa (1970):

$$\ln \left( \frac{\beta}{T_{\max}^2} \right) \approx \ln \left( \frac{ZR}{Ea} \right) - \frac{Ea}{RT_{\max}} \quad (12)$$

donde  $\beta$  es la velocidad de calentamiento ( $\text{K min}^{-1}$ ),  $T_{\max}$  es la temperatura de máxima deflexión (K),  $Z$  es el factor pre-exponencial de la ecuación de Arrhenius ( $\text{min}^{-1}$ ) y  $R$  es la constante de los gases ( $\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$ ).

Graficando los resultados experimentales según la ecuación (12), se puede calcular la  $Ea$  del proceso de desnaturalización térmica de las proteínas de soja a partir de la pendiente de la línea recta obtenida y el factor pre-exponencial,  $Z$ , de la ordenada de origen. Ambas constantes cinéticas fueron calculadas a partir de los valores experimentales aplicando el método de cuadrados mínimos. Se probaron dos modelos de ajuste, uno que contempla una única recta (Modelo I) y otro no lineal que considera dos líneas rectas (Modelo II). Los resultados obtenidos mostraron que los datos experimentales se ajustan mejor al primer modelo analizado. La Figura 44 muestra los resultados experimentales acorde al modelo seleccionado.

Las energías de activación y factores pre-exponenciales calculados para cada una de las proteínas presentes en los aislados de soja (proteínas 7S y 11S) se presentan en la Tabla XIX. Se puede observar que la energía de activación de la proteína 7S es aproximadamente la mitad de la correspondiente a la proteína 11S. Este resultado es esperable considerando la estructura de ambas globulinas. El hecho de haber obtenido, por el método empleado, una única  $Ea$  para  $\beta$ -concliginina sugiere que el mecanismo de reacción involucrado en el proceso de desnaturalización térmica de las subunidades  $\alpha$ ,  $\alpha'$  y  $\beta$  es equivalente. Igual comportamiento se observa en el caso de glicinina.

5. CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA DE PROTEINAS DE SOJA

TABLA XVIII: Temperatura de máxima deflexión ( $T_{max}$ ) correspondiente a los picos I (proteína 7S) y II (proteína 11S) de termogramas de proteinatos de sodio dializados obtenidos a distintas velocidades de calentamiento ( $\beta$ )

Velocidad de calentamiento ( $\beta$ )(°C/min)	$T_{max}$ (°C)	
	pico I	pico II
3	73,3 ± 0,5	89,1 ± 0,8
5	75,6 ± 0,4	90,8 ± 0,5
10	76,9 ± 0,8	91,0 ± 0,2
15	79,6 ± 0,9	92,5 ± 0,6
20	81,1 ± 0,6	93,2 ± 0,1
25	82,5 ± 0,1	93,5 ± 0,9

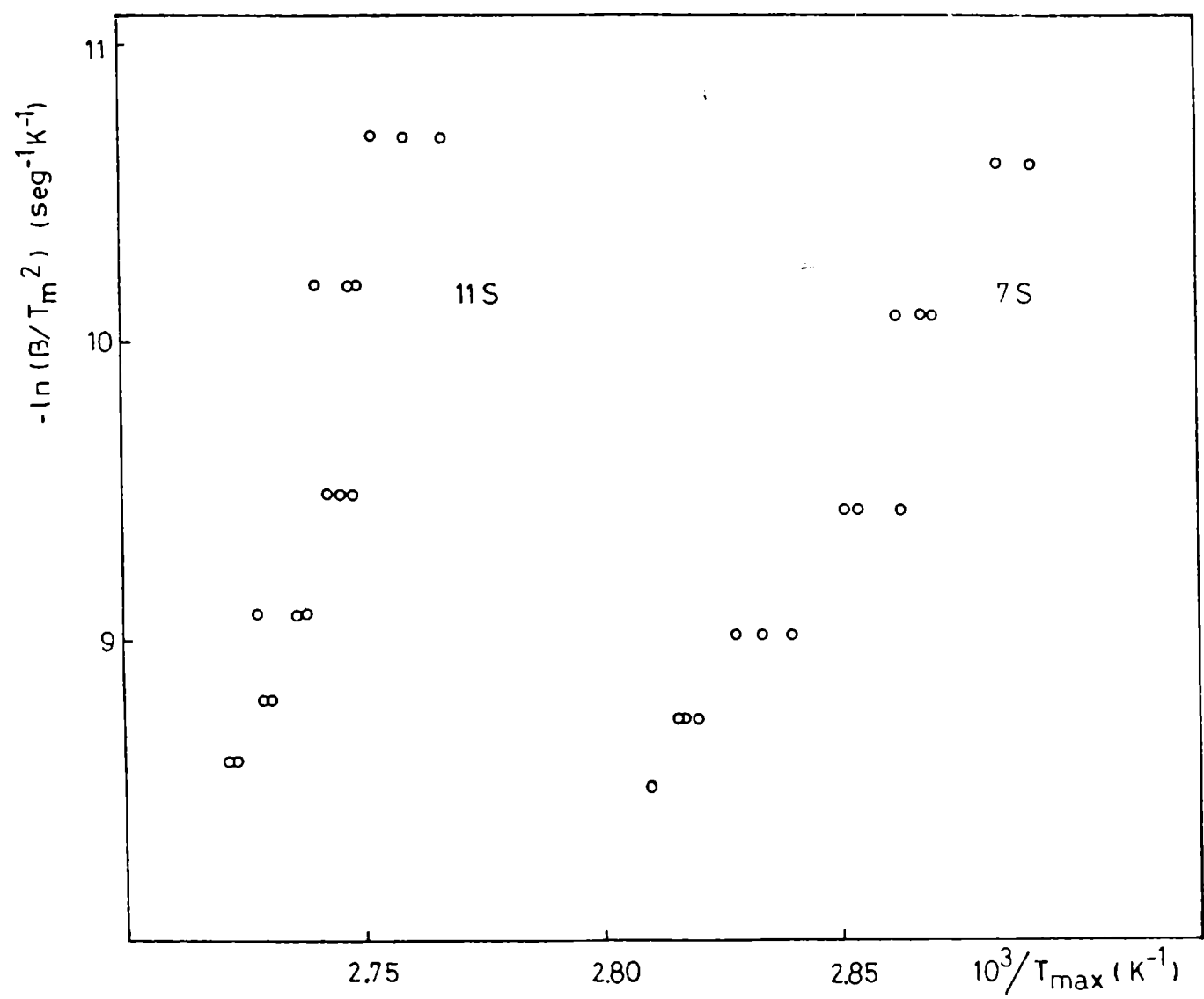


Figura 44: Cálculo de la energía de activación de acuerdo al método de Ozawa.

5. CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA DE PROTEINAS DE SOJA

TABLA XIX: Constantes cinéticas de la desnaturalización de las proteínas 7S (pico I) y 11S (pico II) presentes en un aislado de soja dializado preparado en el laboratorio.

Proteína	Ea (kcal mol <sup>-1</sup> )	Z (min <sup>-1</sup> )
7S	52 400	1.2 10 <sup>33</sup>
11S	106 600	4.0 10 <sup>64</sup>

## 5. CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA DE PROTEINAS DE SOJA

Cabe por último señalar que los valores de energía de activación obtenidos para las proteínas de soja son del orden de los informados para la desnaturalización de otras proteínas tales como  $\beta$ -lactoglobulina (De Wit y Swinkels, 1980); actina (Martens y col., 1982; Wagner y Añón, 1985); miosina (Wright y Wilding, 1984); tripsina y albúmina de huevo (Laidler y Bunting, 1973).

Teniendo en cuenta la ecuación de Arrhenius y los valores de Z y Ea previamente determinados se calcularon las respectivas constantes de velocidad:

$$k_d = Z \cdot e^{-E_a/R T_{max}} \quad (13)$$

Si se asume una cinética de desnaturalización de primer orden respecto al tiempo, orden establecido para la reacción de desplegamiento de diversas proteínas (Yasui y col., 1958; Pelletier y Ouellet, 1961; Penny, 1967; Donovan y col., 1975; Wagner y Añón, 1985; Lupano y Añón, 1987) se puede determinar el tiempo de vida media de las proteínas asociadas a cada transición endotérmica a distintas temperaturas:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (14)$$

En la Tabla XX se muestran las constantes de velocidad y tiempos de vida media calculados a diferentes temperaturas.

A partir de los datos cinéticos determinados se calculó la cantidad de proteínas 7S y 11S que permanece nativa luego de someter a la muestra a un calentamiento isotérmico a distintas temperaturas por un período de 30 min (Tabla XXI). Se puede observar que un calentamiento por corto tiempo a temperaturas superiores a 85°C implica la desnaturalización total de las proteínas que constituyen el aislado. Si el tiempo de calentamiento a 80°C se prolonga por el término de 30 minutos, más del 80% de las proteínas presentes se desnaturalizarán, mientras que a 70°C igual tiempo se

5. CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA DE PROTEINAS DE SOJA

TABLA XX: Constantes de velocidad y tiempo de vida media correspondientes a la desnaturalización de las proteínas 7S (pico I) y 11S (pico II) presentes en un aislado de soja dializado.

Proteína		Temperatura (°C)			
		60	70	80	90
7S	kd (min <sup>-1</sup> )	3,5 10 <sup>-2</sup>	3,7 10 <sup>-1</sup>	3,2	26
	t <sub>1/2</sub> (min)	19,8	1,87	0,21	0,03
11S	kd (min <sup>-1</sup> )	-	2,6 10 <sup>-4</sup>	2,3 10 <sup>-2</sup>	1,5
	t <sub>1/2</sub> (min)	-	2665	30,0	0.46

5. CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA DE PROTEINAS DE SOJA

TABLA XXI: Porcentaje de fracción no-desnaturalizada de las proteínas 7S (pico I) y 11S (pico II) presentes en un aislado de soja dializado luego de 30 min de calentamiento a distintas temperaturas.

Proteína	Temperatura (°C)					
	60	70	75	80	85	90
7S	25%	0%	0%	0%	0%	0%
11S	100%	99,4%	94,3%	50%	0,3%	0%



## 5. CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA DE PROTEINAS DE SOJA

desnaturaliza más de un 60% de la proteína presente. Estos valores son coincidentes con los calculados experimentalmente (Tabla XIV).

### 5.2. Fracciones proteicas parcialmente desnaturalizadas

A efectos de confirmar los parámetros cinéticos determinados con el aislado total de soja, se procedió a la purificación parcial de las dos proteínas principales (7S y 11S) y se estudió, aplicando el método dinámico ya descrito, la cinética de desnaturalización por calor de ambas proteínas. La Figura 45 muestra los termogramas correspondientes a cada proteína, detectándose en este caso una única transición endotérmica indicativa de la purificación lograda. Dicho grado de purificación fue además corroborado mediante electroforesis (SDS-PAGE, en presencia de 2-mercaptoetanol), los densitogramas obtenidos muestran principalmente las subunidades  $\alpha'$ ,  $\alpha$  y  $\beta$  en el caso de la proteína 7S y los polipéptidos ácidos y básicos para la proteína 11S (Figura 46a y b).

Las temperaturas de máxima deflexión y los valores de entalpía obtenidos por DSC para ambas proteínas para  $\beta = 10^\circ\text{C}/\text{min}$ , fueron  $T_{\text{max}} = 76 \pm 0,36^\circ\text{C}$ ,  $\Delta H = 3,3 \text{ cal/g}$  y  $T_{\text{max}} = 87,9 \pm 0,28^\circ\text{C}$ ,  $\Delta H = 4,7 \pm 0,31 \text{ cal/g}$ , para las proteínas 7S y 11S respectivamente.

De acuerdo a los valores obtenidos mediante electroforesis los aislados preparados en el laboratorio contienen en promedio 37% de proteína 7S y 44% de proteína 11S. Si se consideran estas proporciones y los valores de entalpía antes mencionados es posible calcular el valor de la entalpía de desnaturalización del aislado total.

$$\Delta H_{\text{total}} = \Delta H_{7S} \cdot 7S\% + \Delta H_{11S} \cdot 11S\% \quad (15)$$

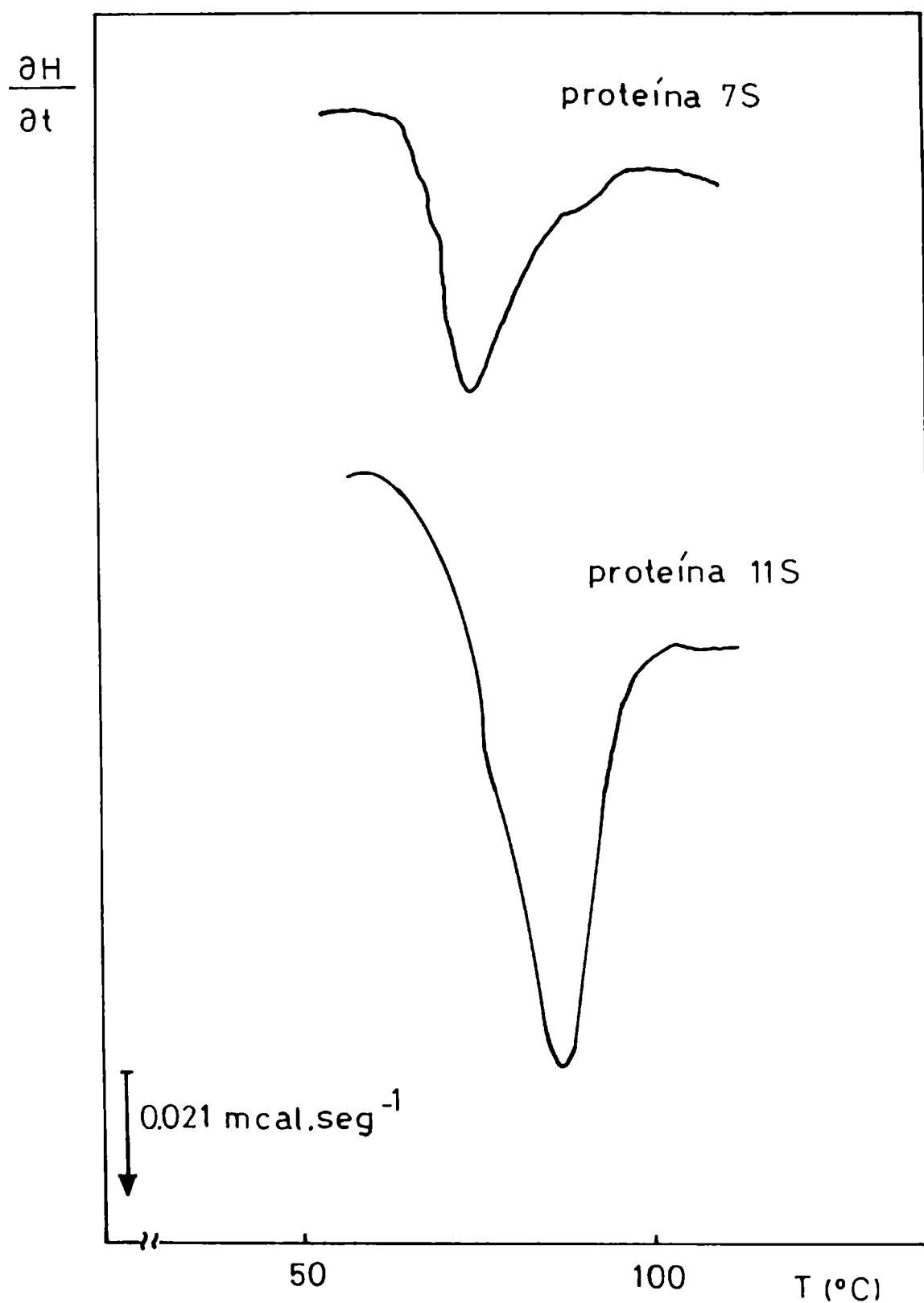


Figura 45: Termogramas de DSC de: a) proteína  $\beta$ -conglucina (proteína 7S), b) proteína glicina (proteína 11S). Velocidad de calentamiento:  $10^{\circ}\text{C} \text{ min}^{-1}$ . Sensibilidad:  $0,021 \text{ mcal seg}^{-1}$ . p.s.: peso seco.

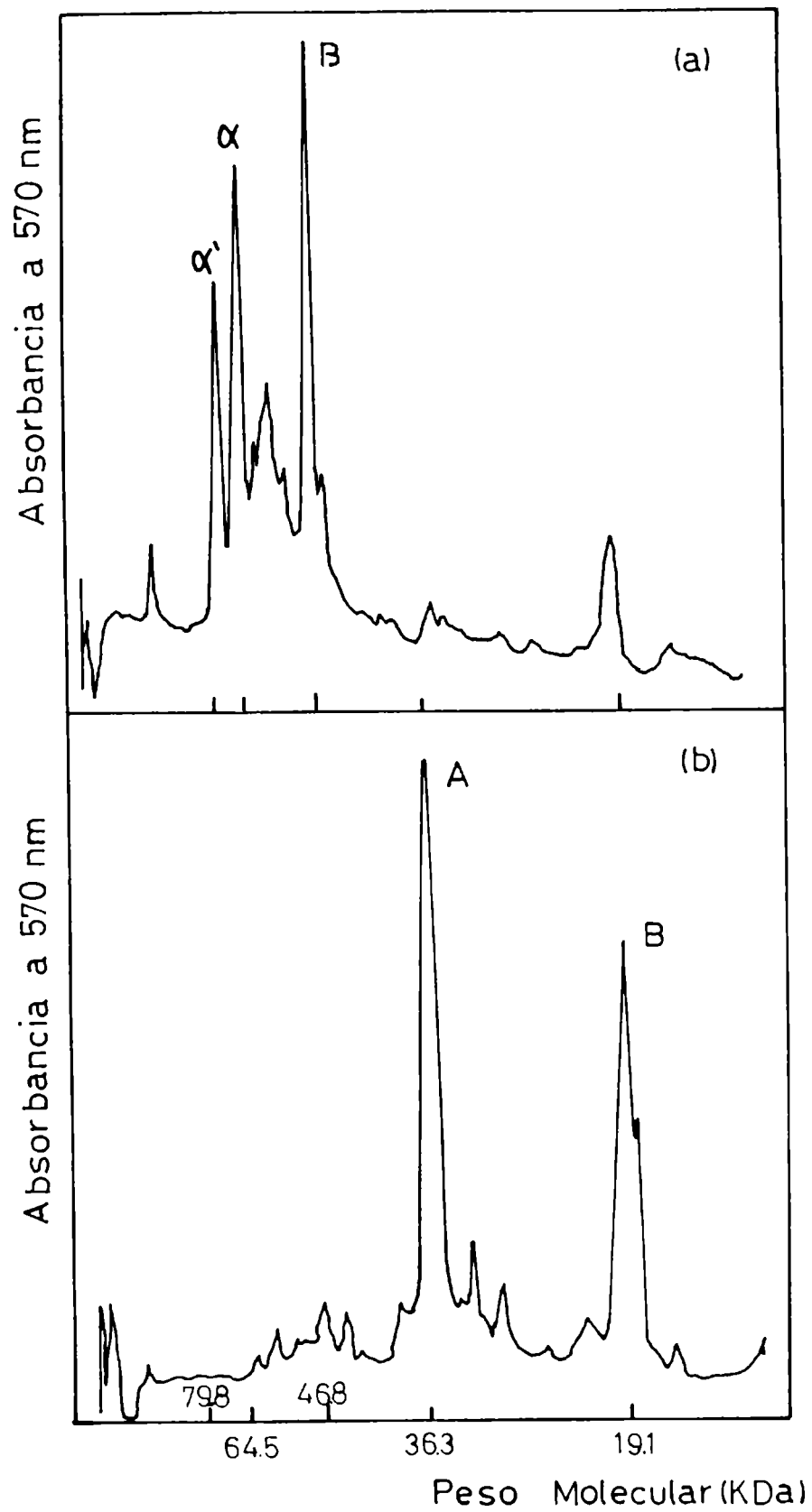


Figura 46: Densitogramas de SDS-PAGE con 2-mercaptoetanol de las proteínas a)  $\beta$ -conglucina (7S) y b) glicina (11S) purificadas en el laboratorio.

## 5. CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA DE PROTEINAS DE SOJA

El resultado que se obtiene (3,4 cal/g) concuerda perfectamente con el obtenido experimentalmente (3,6 cal/g).

A partir de termogramas obtenidos a distintas velocidades de calentamiento se calcularon, al igual que para el aislado dializado, los parámetros cinéticos de desnaturalización térmica de las proteínas 7S y 11S parcialmente purificadas.

La Tabla XXII muestra los valores de energía de activación y factor pre-exponencial y la Tabla XXIII la constante de velocidad y tiempo de vida media obtenidos para las proteínas 7S y 11S parcialmente purificadas. Se puede observar una buena concordancia entre los valores correspondientes a las proteínas parcialmente purificadas y a los del aislado total; lo que sugiere la ausencia de efectos de protección y/o interacción importantes entre los componentes proteicos del aislado. Estos resultados también indican que más del 90% de la proteína 7S se logra desnaturalizar luego de un tratamiento térmico a 70°C durante 20 min, mientras que para obtener resultados equivalentes con la proteína 11S es necesario calentarla 75 min a 80°C o 2 min a 90°C.

### 5.3. Estimación de las funciones termodinámicas del estado activado

La constante de velocidad de una reacción química puede ser expresada en términos de funciones termodinámicas. Teniendo en cuenta que el proceso de desnaturalización de las proteínas es una reacción monomolecular y que puede ser simplificado como el pasaje de un estado conformacional nativo (N) a otro con un mayor grado de desplegamiento (D), es posible calcular la entropía de activación,  $\Delta S^*$ , empleando la relación de Eyring (Laidler y Bunting, 1973), conocido el factor pre-exponencial de Arrhenius:

**5. CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA DE PROTEINAS DE SOJA**

**TABLA XXII:** Constantes cinéticas de la desnaturalización de las proteínas 7S y 11S parcialmente purificadas.

Proteína	Ea (kcal mol <sup>-1</sup> )	Z (min <sup>-1</sup> )
7S	48 500	1.4 10 <sup>30</sup>
11S	91 800	3.3 10 <sup>55</sup>

5. CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA DE PROTEINAS DE SOJA

TABLA XXIII: Constantes de velocidad y tiempo de vida media correspondientes a la desnaturalización de las proteínas 7S y 11S purificadas.

Proteína		Temperatura (°C)			
		60	70	80	90
7S	kd (min <sup>-1</sup> )	1,5 10 <sup>-2</sup>	1,3 10 <sup>-1</sup>	1,0	6,8
	t <sub>1/2</sub> (min)	46,0	5,3	0.69	0,1
11S	kd (min <sup>-1</sup> )	1,0 10 <sup>-2</sup>	6,3 10 <sup>-4</sup>	2,9 10 <sup>-2</sup>	1,1
	t <sub>1/2</sub> (min)	-	1100	23,1	0,63

## 5. CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA DE PROTEINAS DE SOJA

$$k = \frac{k_B T}{h} \cdot K^* = \frac{k_B T}{h} \cdot e^{\Delta S^*/R} \cdot e^{-\Delta H^*/RT} \quad (16)$$

donde

$k_B$  = constante de Boltzman

$h$  = constante de Plank

$K^*$  = constante de equilibrio entre la forma nativa y la desnaturalizada

$T$  = temperatura (K)

$\Delta S^*$  = entropía de activación (cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)

$\Delta H^*$  = entalpía de activación (cal mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>)

$R$  = constante universal de los gases

En cuanto a la energía libre de activación,  $\Delta G^*$ , y la entalpía de activación,  $\Delta H^*$ , pueden calcularse empleando las relaciones termodinámicas usuales

$$\Delta H^* = E_a - RT \quad (17)$$

donde  $E_a$  es la energía de activación experimental, determinada a partir de la ecuación de Arrhenius. Reemplazando el valor de  $\Delta H^*$  de la ecuación (17) en la ecuación (16), surge que:

$$k = e \cdot \frac{k_B T}{h} \cdot e^{\Delta S^*/R} \cdot e^{-E_a/RT} \quad (18)$$

Si comparamos esta relación con la ecuación de Arrhenius, se observa que el factor pre-exponencial  $Z$  resulta:

$$Z = \frac{e k_B T}{h} \cdot e^{\Delta S^*/R} \quad (19)$$

dado que es posible conocer  $Z$  para cada una de las transiciones endotérmicas del termograma, es posible calcular  $\Delta S^*$ .

La energía libre de activación se puede calcular a partir de la siguiente relación:

## 5. CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA DE PROTEINAS DE SOJA

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad (20)$$

En la Tabla XXIV se presentan los valores de las funciones termodinámicas calculadas para las transiciones endotérmicas correspondientes a las proteínas 7S y 11S presentes en el aislado de soja dializado. Dichas funciones fueron calculadas a 60°C y 80°C.

Se puede observar que los valores calculados son valores típicos de un proceso de desnaturalización (Laidler y Bunting, 1973).

Tanto los valores de la entalpía como de la entropía de activación son mayores para la proteína 11S, lo que implicaría un aumento del número de uniones rotas durante el proceso de desnaturalización y un incremento del desorden molecular, tanto de la proteína como del medio que la rodea, para alcanzar el estado de activación.

$\Delta S^*$  y  $\Delta H^*$  además verifican la relación lineal encontrada por Multon (1970), la que es válida para la desnaturalización de proteínas en medios acuosos y sólidos:

$$\Delta S^* = 0,0030 \Delta H^* - 0,075 \quad (21)$$



5. CINETICA DE DESNATURALIZACION TERMICA DE PROTEINAS DE SOJA

TABLA XXIV: Funciones termodinámicas correspondientes a las transiciones endotérmicas de las proteínas 7S (pico I) y 11S (pico II) presentes en aislados de soja dializados.

Proteína	Temperatura	$\Delta H^*$ (kcal mol <sup>-1</sup> )	$\Delta S^*$ (kcal mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	$\Delta G^*$ (kcal mol <sup>-1</sup> )
7S	80°C	51,70	0,071	23,01
	60°C	51,74	0,071	24,18
11S	80°C	105,90	0,184	24,75
	60°C	105,94	0,184	29,50

## CONCLUSIONES

La funcionalidad de las proteínas de soja se ve profundamente alterada por condiciones del medio y variables de proceso, las cuales modifican las características fisicoquímicas y estructurales intrínsecas de estas macromoléculas.

La exposición de soluciones diluídas (menores del 5% p/v) de aislados de soja a altas temperaturas (superiores a 60°C) provoca la desnaturalización de sus proteínas, un aumento de la hidrofobicidad superficial y una activación de las reacciones de oxidación y de intercambio SH/S-S lo que induce a una disminución del contenido de grupos sulfhidrilos libres. Las variaciones de hidrofobicidad y sulfhidrilos libres se manifiestan marcadamente en el rango de temperatura comprendido entre 60-77°C, temperaturas a las cuales el desplegamiento molecular es notable. Los estudios electroforéticos realizados demuestran que la subunidad  $\beta$  de  $\beta$ -conglycinina es la más sensible a la agregación por efecto de la temperatura, seguida por el polipéptido B de la glicinina.

A concentraciones proteicas mayores (5-13% p/v) iguales tratamientos térmicos son acompañados por desnaturalización y formación de agregados solubles o insolubles. Los agregados inicialmente están formados por subunidades  $\beta$  (proteína 7S) y polipéptidos B (proteína 11S) (agregados  $\beta$ -B), pero a medida que el tratamiento es más intenso se incorporan a los mismos las subunidades  $\alpha$  y  $\alpha'$  (proteína 7S). Concluimos que los agregados formados se encuentran estabilizados no sólo por fuertes asociaciones hidrofóbicas (tal como lo indica la disminución de la hidrofobicidad superficial que acompaña su formación) sino también por uniones disulfuro.

El análisis cinético realizado mediante calorimetría diferencial de barrido indica que la desnaturalización de  $\beta$ -conglycinina y glicinina es una reacción de primer orden, siendo las energías aparentes de activación de 52.400 y 106.600 Kcal mol<sup>-1</sup>, respectivamente. Los valores de  $\Delta H^*$  y  $\Delta S^*$

calculados muestran que el número de uniones que deben romperse y el grado de desorden molecular que debe lograrse para alcanzar el estado de activación es superior para glicinina que para  $\beta$ -conglucina.

En ambos casos ( $\beta$ -conglucina y glicinina) se logra distinguir un único mecanismo de reacción para las subunidades y polipéptidos que las constituyen.

Los cambios detectados en las características fisicoquímicas y estructurales de las proteínas inciden de manera diferencial en la manifestación de distintas propiedades funcionales. Así hemos podido determinar que la solubilidad de los aislados proteicos de soja se ve afectada por todos aquellos factores que favorecen las interacciones moleculares, tales como el tratamiento térmico a alta concentración de proteínas y/o la presencia de sales ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Ca(OH)}_2$ ). Cabe destacar que si bien en todos los casos se logra una disminución de la solubilidad los agregados proteicos formados varían en composición y estructura. Esta variación resulta de fundamental importancia para la manifestación de otra propiedad funcional, como lo es la capacidad de absorción de agua (WIC). La misma queda determinada por una relación de compromiso entre la solubilidad de las proteínas y el tipo y grado de agregación, obteniéndose valores máximos a solubilidades intermedias con formación de grandes agregados. El estado de desnaturalización de las proteínas incide en la WIC a través de su tendencia a la agregación.

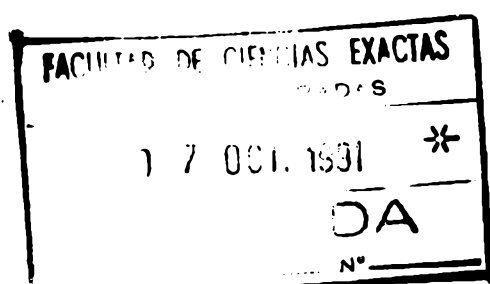
Con referencia a la viscosidad aparente de las soluciones de aislados de soja concluimos que la misma depende de la concentración y grado de hidratación de las proteínas, estimado a través de la proporción de agua total a agua embebida (T/I). Para contenidos de agua libre superiores al 75% y de proteínas inferiores al 2,5% las partículas son cinéticamente independientes prevaleciendo el comportamiento Newtoniano. En tanto que a valores de agua libre inferiores al 25% y contenidos de proteínas superiores al 7%

las interacciones interpartículas se intensifican provocando un aumento pronunciado de la viscosidad aparente. De acuerdo a nuestros resultados, el control de las características de flujo de las proteínas presentes en los aislados depende del grado de hidratación de las partículas más que de su concentración. Debe recordarse que la hidratación proteica es afectada por el tratamiento térmico y el agregado de calcio.

La capacidad de emulsificación de las proteínas de soja es función de su hidrofobicidad superficial, la que a su vez se incrementa con el nivel de desenrollamiento molecular y disminuye con el grado de agregación. La falta de correlación entre la capacidad de emulsificación y la solubilidad, indicaría que la fracción de proteínas insolubles interactúa con la fase no-polar dependiendo de la naturaleza de los agregados presentes (formados por acción de tratamientos térmicos y/o de óxido-reducción y/o agregado de sales, etc.).

Por último comprobamos que la capacidad de gelificación de los aislados proteicos de soja correlaciona con el contenido de grupos sulfhidrilos libres que posea, el que es función del tratamiento térmico y/o la acción de agentes de óxido-reducción. Aquellos aislados en los cuales la fracción IIS es reducida, exhiben muy bajo poder gelificante. Este comportamiento se relaciona con dos hechos: - la dificultad de estas proteínas para iniciar el proceso de gelificación, pues se encuentran altamente agregadas; - la baja posibilidad de estas proteínas para formar puentes disulfuro durante el proceso de gelificación, lo que resta firmeza al gel.

Un elevado contenido de calcio también inhibe la capacidad de gelificación de las proteínas de soja; este efecto lo atribuimos a la formación de agregados mediados por el calcio no compatibles con el proceso normal de formación del gel.



*Alca*  
Dr. N. C. Anón

## BIBLIOGRAFIA

- 
- AOAC, Official Methods of Analysis (1945) Sexta Edición, p. 27.
  - Aoki, H.; Taneyama, O. y Inami, M. (1980) J. Food Sci. 45, 534.
  - Arakawa, T. y Timasheff, S. (1985) Methods in Enz. 114, 49.
  - Arntfield, S.D. y Murray, E.D. (1981) Can. Inst. Food Sci. 14, 289.
  - ASTM E 698 (1979) Standard test method for: Arrhenius kinetic constants thermally unstable materials.
  - Babajimopoulos, M.; Damodaran, S.; Riuzi, S. y Kinsella, J.E. (1983) J. Agric. Food Chem. 31, 1270.
  - Badley, R.A.; Atkinson, D.; Hauser, H.; Oldani, D.; Green, J.P. y Stubbs, J.M. (1975) Biochim. Biophys. Acta 412, 214.
  - Barton, K.A.; Thompson, J.F.; Madison, J.T.; Rosenthal, R.; Jarvis, N.P. y Beachy, R.N. (1982) J. Biol. Chem. 257, 6089.
  - Beachy, R.N.; Jarvis, N.P. y Barton, K.A. (1981) J. Mol. Appl. Genet. 1, 19.
  - Beveridge, T.; Toma, S.J. y Nakai, S. (1974) J. Food. Sci. 39, 49.
  - Blank, M.L.; Schmit, J.A. y Privex, O.S. (1964) J. Am. Chem. Soc. 41, 371.
  - Brooks, J.R. y Morr, C.V. (1985) J. Am. Oil Chem. Soc. 62, 1347.
  - Catsimpoolas, N. (1969) Cereal Chem. 46, 369.
  - Catsimpoolas, N. (1970) Cereal Chem. 47, 70.
  - Catsimpoolas, N.; Berg, T. y Meyer, E.W. (1971b) J. Protein Res. 3, 63.
  - Catsimpoolas, N. y Meyer, E.W. (1970) Cereal Chem. 47, 559.
  - Catsimpoolas, N.; Keeney, J.A.; Meyer, E.W. y Szuhaj, B.F. (1971a) J. Sci. Food Agric. 22, 448.
  - Catsimpoolas, N.; Leuthner, E. y Meyer, E.W. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 127, 338.
  - Catsimpoolas, N.; Rogers, D.A.; Circle, S.J. y Meyer, E.W. (1967) Cereal Chem. 44, 631.

- Clarke, R.F.L. y Nakai, S. (1972) *Biochem. Biophys. Acta* 257, 61.
- Coates, J.B.; Madeiros, J.S.; Thanh, V.H. y Nielsen, N.C. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 243, 184.
- Coscia, A. (1989) *Actas de la IV Conferencia Mundial de Investigación en Soja*, IV, 1879.
- Cheftel, J.C.; Cuq, J.L. y Lorient, L. (1985) En: "Food Chemistry", Ed. D.R. Fennema. New York, Marcel Dekker, Inc., p. 282.
- Damodaran, S. (1988) *J. Agric. Food Chem.* 36, 262,
- Damodaran, S. (1989) En: "Food Proteins", Eds. J.E. Kinsella y W.G. Soucie, The American Oil Chemists' Society, Champaign, p. 21.
- Damodaran, S. y Kinsella, J.E. (1982a) *J. Agric. Food Chem.* 30, 812.
- Damodaran, S. y Kinsella, J.E. (1982b) En: "Food protein deterioration", Ed. J.P. Cherry. ACS Symposium series 206, New York, p. 327.
- De Wit, J.N. y Swinkels, G.A.M. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 624, 40.
- Donovan, J.W.; Mapes, C.J.; Gorton Davis, J. y Garibaldi, J.A. (1975) *J. Sci. Food Agric.* 26, 73.
- Draper, M. y Catsimpoolas, N. (1978) *Cereal Chem.* 55, 16.
- Duswalt, A.A. (1974) *Thermochimica Acta* 8, 57.
- Ellman, G.L. (1959) *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70.
- Epton, S.R. (1948) *Trans. Faraday Soc.* 44, 226.
- Ereken-Tumer, N.; Richter, J.D. y Nielsen, N.C. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 4016.
- Fleming, S.E.; Sosulski, F.W.; Kilara, A. y Humbert, E.S. (1974) *J. Food Sci.* 39, 188.
- Folch, J.; Lees, M. y Sloane-Stanley, G.H. (1957) *J. Biol. Chem.* 226, 497.
- *Foods and Food Production Encyclopedia* (1982), Eds. D.M. Considine and G.D. Considine, Van Nostrand Reinhol, Co.
- Frank, H.S. y Evans, M.W. (1945) *J. Chem. Phys.* 13, 507.
- Fukushima, D. (1979) *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56, 357.



- Fukushima, D. (1981) J. Am. Oil Chem. Soc. 58, 346.
- Gornall, A.C.; Bardawill, C.J. y David, M.M. (1949) J. Biol. Chem. 177, 751.
- Hatefi, Y. y Hanstein, W.G. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 62, 1129.
- Hayakawa, S. y Nakai, S. (1985) J. Food Sci. 50, 486.
- Hermansson, A.M. (1972) Lebensm. Wiss. Technol. 5, 24.
- Hermansson, A.M. (1975) J. Text. Stud. 5, 425.
- Hermansson, A.M. (1978) J. Text. Stud. 9, 33.
- Hermansson, A.M. (1979) J. Am. Oil Chem. Soc. 56, 272.
- Hermansson, A.M. (1986a) J. Am. Oil Chem. Soc. 63, 658.
- Hermansson, A.M. (1986b) En: "Food macromolecules", Eds. J.R. Mitchell y D.A. Ledward. Elsevier Applied Science Publishers, New York, p. 287.
- Hill, J.E. y Breindenbach, R.W. (1974) Plant Physiol. 53, 742.
- Honig, D.H. y Wolf, W.J. (1987) J. Agric. Food Chem. 35, 583.
- Horiuchi, T.; Fukushima, D.; Sugimoto, H. y Hattori, T. (1978) Food Chem. 3, 35.
- Iibuchi, C. e Imahori, K. (1978) Agric. Biol. Chem. 42, 31.
- Iyengar, R.B. y Raveststein, P. (1981) Cereal Chem. 58, 325.
- Junta Nacional de Granos (1990) "Indicadores de coyuntura del mercado de granos".
- Kato, A. y Nakai, S. (1980) Biochim. Biophys. Acta 624, 13.
- Kato, A.; Takahashi, A.; Matsudomi, N. y Kobayashi, K. (1983a) J. Food Sci. 48, 62.
- Kato, A.; Osako, Y.; Matsudomi, N. y Kohayashi, K. (1983b) Agric. Biol. Chem. 47, 33.
- Kato, A.; Matsuda, T.; Matsudomi, N. y Kohayashi, K. (1984) J. Agric. Food Chem. 32, 284.
- Kauzman, W. (1959) Adv. Protein Chem. 14, 1.

- Kella, N.K.D. y Kinsella, J.E. (1985) J. Biochem. Biophys. Methods **11**, 251.
- Keshavara, E. y Nakai, S. (1979) Biochim. Biophys. Acta **576**, 269.
- Kilara, A. (1976) CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **23**, 323.
- Kim, S.H. y Kinsella, J.E. (1986) J. Agric. Food Chem. **34**, 623.
- Kinsella, J.E. (1979) J. Am. Oil Chem. Soc. **56**, 242.
- Kinsella, J.E. (1982) En: "Food protein deterioration", Ed. J.P. Cherry, ACS Symposium series 206. New York, p. 301.
- Kinsella, J.E. y Damodaran, S. (1981) En: "Criteria of Food Acceptance", Foster-Verlag, Switzerland.
- Kissinger, H.E. (1956) J. Res. Nat. Bur. Stand. **57**, 217.
- Kissinger, H.E. (1957) Anal. Chem. **29**, 1702.
- Kitamura, K. y Shibasaki, K. (1975) Agric. Biol. Chem. **39**, 945.
- Kitamura, K.; Takagi, T. y Shibasaki, K. (1976) Agric. Biol. Chem. **40**, 1837.
- Kitamura, K.; Takagi, T. y Shibasaki, K. (1977) Agric. Biol. Chem. **41**, 883.
- Koshiyama, I. (1968) Cereal Chem. **45**, 394.
- Koshiyama, I. (1972) Int. J. Peptide Protein Res. **4**, 167.
- Koshiyama, I. y Fukushima, D. (1976a) Phytochemistry **15**, 157.
- Koshiyama, I. y Fukushima, D. (1976b) Phytochemistry **15**, 161.
- Laemmli, U.K. (1970) Nature **227**, 680.
- Laemmli, U.K. y Favre, M. (1973) J. Mol. Biol. **80**, 575.
- Laidler, K.J. y Bunting, P.S. (1973) En: "The Chemical Kinetics of Enzyme Action", Oxford University Press, p. 413.
- Li-Chan, E. (1983) J. Food Sci. **48**, 47.
- Li-Chan, E.; Nakai, S. y Wood, D.F. (1984) J. Food Sci. **49**, 345.
- Liener, I. (1979) J. Am. Oil Chem. Soc. **56**, 121.

- 
- Lowry, O.H.; Rosebroug, H.J.; Lewis, A. y Randall, K.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265.
  - Lupano, C.E. y Añón, M.C. (1987) Cereal Chem. 64, 437.
  - Martens, H.; Stabursvik, E. y Martens, M. (1982) J. Text. Stud. 13, 291.
  - Melander, W. y Horvath, C. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 185, 200.
  - Menjivar, J. y Rha, C.K. (1980) En: "Rheology: fluids", vol. 2, Eds. G. Astarita, G. Marrucci y L. Nicholars, Plenum Press, New York, p. 293.
  - Mitsuda, H.; Kusano, T. y Hasegawa, K. (1965) Agric. Biol. Chem. 29, 7.
  - Mori, T.; Utsumi, S. e Inada, H. (1979) Agric. Biol. Chem. 43, 2317.
  - Mori, T.; Utsumi, S.; Inada, H.; Kitamura, K. y Harada, K. (1981) J. Agric. Food Chem. 29, 20.
  - Mustakas, G.C.; Moulton, K.J.; Baker, E.C. y Kwolek, W.F. (1981) J. Am. Oil Chem. Soc. 58, 300.
  - Nakamura, T.; Utsumi, S. y Mori, T. (1986) Agric. Biol. Chem. 50, 2429.
  - Nakamura, T.; Utsumi, S.; Kitamura, K.; Harada, K. y Mori, T. (1984) J. Agric. Food Chem. 32, 647.
  - Nash, A.M.; Eldridge, A.C. y Wolf, W.J. (1967) J. Agric. Food Chem. 15, 102.
  - Nielsen, N.C. (1985) J. Am. Oil Chem. Soc. 62, 1680.
  - Nosaki, Y. y Tanford, C.J. (1971) J. Biol. Chem. 246, 2211.
  - Ochiai-Yanagi, S.; Takagi, T.; Kitamura, K.; Tajima, M. y Watanabe, T. (1977) Agr. Biol. Chem. 41, 647.
  - Ohren, J.A. (1981) J. Am. Oil Chem. Soc. 58, 333.
  - Ozawa, T. (1970) J. Thermal Anal. 2, 301.
  - Pearson, A.M. (1976) BioScience 26, 249.
  - Pearson, A.M. (1982) En: "Developments in Food Proteins-2", Ed. B.J. Hudson, Applied Science Publishers, London, p.
  - Pelletier, G.E. y Ouellet, L. (1961) Can. J. Chem. 39, 265.

- Penny, I.F. (1967) *Biochem. J.* 104, 609.
- Pradipasena, P. y Rha, C.K. (1977) *Polymer Eng. Sci.* 17, 861.
- Privalov, P.L. y Khechinashvili, N.N. (1974) *J. Mol. Biol.* 86, 665.
- Rackis, J.J. (1972) En: "Soybeans: Chemistry and Technology", Ed. A.K. Smith y S.j. Circle. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, p. 152.
- Rha, C.K. y Pradipasena, P. (1986) En: "Functional properties of food macromolecules", Eds. J.R. Mitchell y D.A. Ledward, Elsevier Applied Science Publishers, Ltd., New York, p. 79.
- Saio, K.; Kajikawa, M. y Watanabe, T. (1971) *Agric. Biol. Chem.* 35, 890.
- Saio, K.; Sato, I. y Watanabe, T. (1974) *J. Food Sci. Technol.* 21, 234.
- Saio, K.; y Watanabe, T. (1978) *J. Text. Stud.* 9, 135.
- Sair, U.S. (1959) Patente 2881076 (USA).
- Schmidt, R.H. y Morris, H.A. (1984) *Food Technology* 38, 85.
- Schuler, M.A.; Schmitt, E.S. y Beachy, R.N. (1982) *Nucleic Acid Res.* 10, 8225.
- Serrato, A.G. (1981) *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 58, 157.
- Shen, J.L. (1976) *J. Agric. Food Chem.* 24, 784.
- Shiga, K. y Nakamura, Y. (1987) *J. Food Sci.* 52, 681.
- Shimada, K. y Cheftel, J.C. (1988) *J. Agric. Food Chem.* 36, 147.
- Shimada, K. y Matsushita, S. (1980) *Agric. Biol. Chem.* 44, 637.
- Simard, C. y Boulet, M. (1978) *Can. Inst. Food Sci. Technol.* 11, 45.
- Sklar, L.A.; Hudson, B.S.; Petersen, M. y Diamond, J. (1977) *Biochemistry* 16, 813.
- Staswick, P.E.; Hermodson, M.A. y Nielsen, N.C. (1981) *J. Biol. Chem.* 256, 8752.
- Staswick, P.E.; Hermodson, M.A. y Nielsen, N.C. (1984a) *J. Biol. Chem.* 259, 13431.
- Steinhardt, J.; Scott, J.R. y Birdi, K.S. (1977) *Biochemistry* 16, 718.
- Sykes, G.E. y Gayler, K.R. (1981) *Arch. Biochem. Biophys.* 210, 525.

- Takagi, S.; Okamoto, N.; Akashi, M. y Yasumatsu, K. (1979) *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkai-shi* 26, 139.
- Tanford, C. (1962) *J. Am. Chem. Soc.* 84, 4240.
- Tejada, M.; Borderias, A.J. y Jiménez-Colmenero, F. (1984) *Proc. MOCCA*, Vol. I, 103.
- Thanh, V.H. y Shibasaki, K. (1976a) *J. Agric. Food Chem.* 6, 1117.
- Thanh, V.H. y Shibasaki, K. (1976b) *Biochim. Biophys. Acta* 439, 326.
- Thanh, V.H. y Shibasaki, K. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 490, 370.
- Thanh, V.H. y Shibasaki, K. (1978) *J. Agric. Food Chem.* 26, 692.
- Turatti, J.M. y Canto, W.L. (1989) *Actas de la IV Conferencia Mundial de Investigación en Soja*, IV, 1774.
- Urbanski, G.E.; Wei, L.S.; Nelson, A.J. y Steinberg, M.P. (1983) *J. Food Sci.* 48, 691.
- Utsumi, S.; Damodaran, S. y Kinsella, J.E. (1984) *J. Agric. Food Chem.* 32, 1406.
- Utsumi, S.; Inaba, H. y Mori, T. (1981) *Phytochemistry* 20, 585.
- Utsumi, S. y Kinsella, J.E. (1985a) *J. Agric. Food Chem.* 33, 297.
- Utsumi, S. y Kinsella, J.E. (1985b) *J. Agric. Food Chem.* 50, 1278.
- Van Kleef, F.S.M. (1986) *Biopolymers* 25, 31.
- van Oss, C.J.; Absolom, D.R. y Neuman, A.W. (1979) *Sep. Sci. Technol.* 14, 305.
- Voutsinas, L.P.; Cheung, E. y Nakai, S. (1983) *J. Food Sci.* 48, 26.
- Wagner, J.R. y Añón, M.C. (1985) *J. Food Sci.* 50, 1547.
- Wagner, J.R. y Añón, M.C. (1990) *J. Food Sci.* 55, 765.
- Wolf, W.J. (1970) *J. Agric. Food Chem.* 18, 969.
- Wolf, W.J. y Cowan, J.C. (1975) "Soybean as a food source" Rev. ed. CRC Press, Cleveland.
- Wolf, W.J. y Sly, D.A. (1967) *Cereal Chem.* 44, 653.

- Wright, D.J. (1982) En: "Developments in food proteins-1", Ed. B.J.F. Hudson, Applied Science Publishers, London, p. 61.
- Wright, D.J. y Wilding, P. (1984) J. Sci. Food Agric. 35, 367.
- Yamauchi, F.; Sato, M.; Sato, W.; Kamata, Y. y Shibasaki, K. (1981) Agric. Biol. Chem. 45, 2863.
- Yamauchi, F.; Thanh, V.H.; Kawase, M. y Shibasaki, K. (1976) Agric. Biol. Chem. 40, 691.
- Yamauchi, F.; Ogawa, Y.; Kamata, Y. y Shibasaki, K. (1982) Agric. Biol. Chem. 47, 33.
- Yasui, T.; Fukazawa, T.; Hashimoto, Y.; Kitagawa, S. y Sasaki, A. (1958) J. Biochem. 45, 717.
- Young, V.R.; Schimshaw, N.S.; Torum, B. y Viteri, F. (1979) J. Am. Oil Chem. Sci. 56, 111.